

**Entwicklung eines Verfahrens der zweidimensionalen
Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteine und
Glykoproteine der Zytoplasmamembran, erarbeitet
am Erythrozyten des Menschen**

von

Volker Anselstetter

aus

Altdorf

1974
—

10751024



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548410_0006

AN DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

INSTITUT FÜR ANATOMIE

LEHRSTUHL FÜR ANATOMIE

VERGLEICHENDE ANATOMIE UND ZOOLOGIE

BEZÜGLICH DER VERÄNDERUNG DER VERHÄLTNISSE
ZUSAMMENGESETZTER ORGANISMEN UND DER VERÄNDERUNG
DER VERHÄLTNISSE DER VERHÄLTNISSE, BEZÜGLICH
DER VERHÄLTNISSE DER VERHÄLTNISSE

VERGLEICHENDE ANATOMIE UND ZOOLOGIE

LEHRSTUHL FÜR ANATOMIE

VERGLEICHENDE ANATOMIE UND ZOOLOGIE

LEHRSTUHL FÜR ANATOMIE

VERGLEICHENDE ANATOMIE

VERGLEICHENDE ANATOMIE

LEHRSTUHL

VERGLEICHENDE ANATOMIE

LEHRSTUHL

VERGLEICHENDE ANATOMIE

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Vorstand Professor Dr. W. Kersten

**Entwicklung eines Verfahrens der zweidimensionalen
Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteine und
Glykoproteine der Zytoplasmamembran, erarbeitet
am Erythrozyten des Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Volker Anselstetter
aus
Altdorf

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. L. Demling

Referent: Prof. Dr. H.-J. Horstmann

Korreferent: Prof. Dr. W. Kersten

Tag der mündlichen Prüfung: 5. August 1974

	Seite
A. Einleitung	1
B. Experimenteller Teil	3
1. Entwicklung eines Trennverfahrens für Membranproteine mit hoher analytischer Auflösung	3
1.1 Membranproteine	3
1.1.1 Einteilung nach Eigenschaft ihrer Molekülstruktur	3
1.1.2 Charakterisierung einiger Membranproteine von Erythrozyten	5
1.2 Lösungsverhalten der Membranproteine von Erythrozyten	10
1.3 Trennung von Membranproteinen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese	14
1.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen in einem Essigsäure-Harnstoff-System unter Verwendung von Phenol-Eisessig-Wasser als Lösungsmittel	17
1.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat	21
1.4 Entwicklung einer Methode der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen	24
1.4.1 Prinzip der Methode, Vorversuche	24
1.4.2 Optimierung der Methode	33
1.4.2.1 Lösen der Membran	33
1.4.2.2 Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
1.4.2.3 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
1.4.3 Standardisierung der Methode und Ergebnisse	46

	Seite
2. Anwendung des Verfahrens	57
2.1 Variabilität der Membranproteine	57
2.2 Pathologie von Membranproteinen	61
3. Präparation der Membranen und Bestimmungsmethoden	69
3.1 Präparation der Erythrozytenmembranen	69
3.2 Proteinbestimmung	72
3.3 Molekulargewichtsbestimmung	74
3.4 Färbemethoden und Dokumentation	76
C. Diskussion	79
D. Zusammenfassung	84
Literaturverzeichnis	86

In der Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

BIS = N,N'-Methylenbisacrylamid
DTE = Dithioerythritol
EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure
PAGE = Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS = Perjodat-SCHIFF-Reaktion
SDS = Natriumdodecylsulfat
TEMED = N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

A. Einleitung

Unsere Kenntnisse über die vielfältigen Funktionen der Zytoplasmamembran von Eukaryoten haben gerade in den letzten Jahren beträchtlich zugenommen. Sie vertiefen unsere Einsicht in die bedeutende Rolle, welche den Membranen für die Aufrechterhaltung eines normalen Funktionsablaufs differenzierter Zellen zukommt. Gleichzeitig führten sie zu Vorstellungen, welche Stellung die Membranen in pathologischen Prozessen, besonders in der Tumorphagenese, einnehmen. All das machte das Studium der Membran zu einem Schwerpunkt in der modernen Medizin und Biologie (Eine Übersicht gibt WALLACH (146), 1972).

Die Plasmamembran eukaryoter Zellen ist Träger spezifischer Oberflächenstrukturen, die für die Regulation der Zellteilung, für die Steuerung des Stoffwechsels und für das Erkennen gleichartig differenzierter Zellen von wesentlicher Bedeutung sind. Sie ist Ort des aktiven und passiven Transports, der Pinozytose und Phagozytose. In ihren Strukturelementen liegen die Ursachen bestimmter elektrischer Eigenschaften, wie Oberflächenladung, Membranpotential und kapazitiver Widerstand. Damit sollen nur einige der wesentlichsten Beispiele aus der beeindruckend großen Zahl verschiedenster Membranfunktionen angesprochen sein (vgl.1) Die Ergebnisse von Transplantationsversuchen haben gezeigt, daß das Proteinmuster in der Membran einer Zelle eine spezifische, vom Individuum abhängige Zusammensetzung zeigt. (2). Die Komplexität des Membranproteinmusters der verschiedenen Zellarten eines Organismus variiert in starkem Maße. Man konnte bisher keine ubiquitär vorkommenden Membranproteine finden, vielmehr weisen die Membranen einer bestimmten

Zellart eine für sie typische Proteinkomposition auf (vgl.3). Darüber hinaus ist die Komplexität des Proteinmusters einer Membran um so größer, je vielfältiger ihre Funktionen sind (4).

Unsere Kenntnisse über die Topographie der Plasmamembran wachsen langsam (5). Die bisher entwickelten Modelle der Membranstruktur berücksichtigen in zunehmendem Maße dynamische Aspekte (6). Bis zum erklärten Ziel der Membranbiologie, der Zuordnung von Strukturen zu Funktionen, ist jedoch noch ein weiter Weg zurückzulegen. Eine genaue Bestandsaufnahme aller in einer Plasmamembran vorkommenden Proteine, gefolgt von ihrer Isolierung und Charakterisierung, sind Etappen dieses Weges.

Es war die Aufgabe dieser Arbeit, eine Methode zu finden, die es ermöglicht, alle Proteine der Membran nach vollständiger Lösung durch zweidimensionale Elektrophorese voneinander zu trennen. Untersuchungsobjekt war die Plasmamembran menschlicher Erythrozyten.

B. Experimenteller Teil

1. Entwicklung eines Trennverfahrens für Membranproteine mit hoher analytischer Auflösung

1.1 Membranproteine

1.1.1 Einteilung nach Eigenschaft ihrer Molekülstruktur

Das Wissen um die wichtigsten Moleküleigenschaften von Membranproteinen und deren Variationsbreite ist notwendig, um eine der Wirklichkeit möglichst entsprechende Vorstellung zu erreichen. Deshalb werden diese Eigenschaften hier zunächst allgemein und anschließend speziell an einigen Beispielen von Proteinen der Erythrozytenmembran erläutert. Damit soll gleichzeitig ein Eindruck davon vermittelt werden, welche konkreten Angaben bis heute über einige wenige Proteine der Erythrozytenmembran gemacht werden können - und wo die Schwierigkeiten für eine notwendige Fortentwicklung unserer Kenntnisse auf diesem Gebiet liegen.

Die Basis für eine sinnvolle Definition und Einteilung von Membranproteinen war lange Zeit nicht gegeben (7). Der Versuch, mit Hilfe eines sogenannten Polaritätsindex (8) Membranproteine zu charakterisieren und von anderen Proteinen zu unterscheiden, erlaubt keine klaren Alternativentscheidungen. Erst neuere Erkenntnisse über die Membranstruktur, wie sie SINGER (6) in seinem "lipid-globular protein mosaic (LGPM) model" (LGPM-Modell) wiedergibt, ermöglichen eine Definition und Einteilung von Membranproteinen aufgrund von Moleküleigenschaften.

Die Lipidzusammensetzung der Erythrozytenmembran ist seit langem bekannt (9-12). Hervorstechendes Merkmal aller Membranlipide ist ihre amphipathe Natur. Das heißt, die Moleküle sind Träger sowohl hydrophober wie hydrophiler Gruppen, besitzen demnach einen wasserunlöslichen und einen wasserlöslichen Anteil. Diese Eigenschaften der Membranlipide ist verantwortlich für die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht in wässriger Umgebung wie auch in den Membranen.

Hinsichtlich der Membranproteine unterscheidet man integrierte und periphere Membranproteine. (Eine andere analog gebrauchte Bezeichnung unterscheidet in "intrinsic membrane proteins" und "extrinsic membrane proteins" (13). Diese Unterteilung wird durch die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen gefriergeätzter Membranen bestätigt (14).

Integrierte Membranproteine haben ebenfalls eine amphipathe Struktur; sie sind in der intakten Membran Teil des Membrankontinuums: Ihre polaren Gruppen sind vornehmlich auf der Membranoberfläche lokalisiert und stehen in Kontakt mit der wässrigen Phase der Umgebung, während ihre apolaren Reste, von Wasser abgeschirmt, im Membraninnern geborgen sind. Das Membrankontinuum wird somit von einer Lipiddoppelschicht gebildet, in die mosaikartig Proteine eingelagert, integriert sind. Damit wird deutlich, daß eine amphipathe Molekülstruktur das gemeinsame Merkmal aller Bausteine ist, die am Aufbau des Membrankontinuums beteiligt sind - seien es Lipide oder Proteine.

Periphere Membranproteine sind demgegenüber nicht Teil des Membrankontinuums, sondern sind an die Membran assoziiert. Sie können relativ leicht und

in wasserlöslicher Form von der Membran abgelöst werden.

Eine solche Unterscheidung in integrierte und periphere Proteine ist gerade im Falle der Erythrozytenmembran von besonderer Bedeutung, da diese einen großen Anteil peripherer Proteine aufweist (13). Es muß hier aber deutlich gesagt werden, daß eine solche Unterteilung nichts über die Aufgaben der beiden Klassen von Membranproteinen für die Membranfunktionen aussagt.

Eine praktische Bedeutung erhält diese Unterteilung dadurch, daß sie gleichzeitig Ausdruck eines ganz unterschiedlichen Lösungsverhaltens der beiden Klassen von Membranproteinen ist. Das unterschiedliche Lösungsverhalten wiederum ist ein zentrales Problem aller Versuche zur Trennung und Isolierung von Membranproteinen.

1.1.2 Charakterisierung einiger Membranproteine von Erythrozyten

Obgleich die Erythrozyten und deren Membranproteine Gegenstand intensiver Forschung sind (einen Überblick für die Membranproteine gibt JULIANO (15)), konnten bisher nur wenige Membranproteine näher charakterisiert werden. Es sind dies das sogenannte "Spectrin" (16-24), das Glykolyseenzym Glycerinaldehyd-3P-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (25-29) und ein Glykoprotein, das mittlerweile den Namen "Glycophorin" (30-42) erhalten hat.

An diesen wenigen Beispielen können jedoch bereits die charakteristischen Eigenschaften von Membranproteinen aufgezeigt und die Schwierigkeiten, die ihre Untersuchung erschweren, verdeutlicht werden.

Durch aufeinanderfolgende Behandlung der Membranen mit 0,1 mM EDTA, pH 8,0, und 0,5 M NaCl in 5 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, lassen sich 30-35% der Membranproteine (periphere Membranproteine) in wasserlöslicher Form erhalten. Die restlichen 65-70% der Membranproteine (integrierte Membranproteine) - darunter befinden sich alle Glykoproteine - bilden zusammen mit den Lipiden wasserunlösliche Membranbruchstücke. Das Ergebnis einer solchen Behandlung ist in Abb.1 dargestellt.

Obwohl Spectrin leicht und in großen Mengen erhalten werden kann - es läßt sich durch Anwendung eines Chelatbildners (EDTA) bei extrem niedriger Ionenstärke beinahe quantitativ und in wasserlöslicher Form aus der Membran extrahieren - ist eine eindeutige Charakterisierung bisher nicht gelungen. Die Gründe hierfür sind vor allem folgende:

Alle untersuchten Spectrin-Fraktionen sind heterogen (24,43). Versuche zur Isolierung der beiden Spectrinkomponenten wurden selten unternommen. Eine Isolierung durch präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Totalhydrolyse zeigte nur geringe Unterschiede der Aminosäurezusammensetzung beider Spectrinkomponenten (HIRSCHFELDER H. und HORSTMANN H.-J., unveröffentlicht). Die Frage, ob es sich bei dem sehr hochmolekularen Spectrin um eine einzige Polypeptidkette (23,44) oder um ein aus Untereinheiten aufgebautes Polymer (45-47) handelt, bleibt vorerst offen. Beide Spectrinkomponenten unterscheiden sich stark in ihrer Phosphorylierbarkeit (48-51).

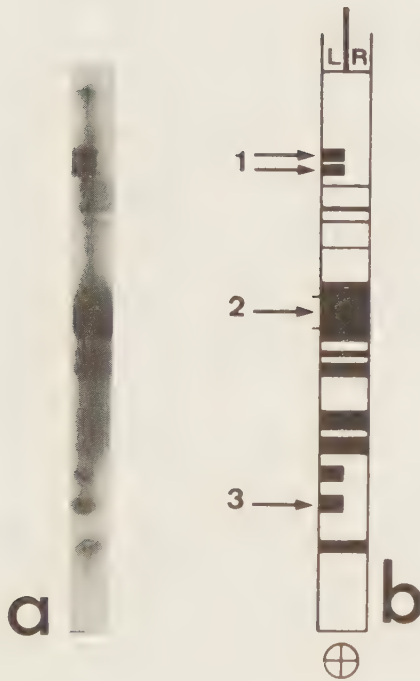


Abb.1 Integrierte und periphere Proteine der menschlichen Erythrozytenmembran. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Splitgel-Technik (a). Das Prinzip dieser Technik ist der schematischen Darstellung (b) zu entnehmen: Der Probenraum oberhalb des Gelstäbchens wurde mit einem Paraffin-getränkten Filterpapierstreifen in zwei Kompartimente (L,R) unterteilt. Eine Lösung der unbehandelten Membran (periphere und integrierte Proteine) wurde bei (L) aufgetragen, eine Lösung der extrahierten Membran bei (R). Die Pfeile zeigen die Positionen der beschriebenen Membranproteine Spectrin (1), Glycophorin (2) und Glycerinaldehyd-3P-Dehydrogenase (3). (Bedingungen der Elektrophorese s.S.22).

Glycophorin läßt sich mit verschiedenen Methoden (32,37) aus der Erythrozytenmembran extrahieren. Es besitzt die für ein integriertes Membranprotein geforderte amphipathe Molekülstruktur (36,39). Erstaunlich ist daher, daß 60% des Molekulargewichtes auf den Kohlenhydratanteil entfallen. Das Molekül ist über einen hydrophoben Abschnitt im Proteinanteil durch hydrophobe Wechselwirkungen fest in der Lipidschicht der Membran verankert. Daher kann Glycophorin trotz seines hohen Kohlenhydratgehaltes nicht in wasserlöslicher Form erhalten werden, es sei denn diese hydrophoben Wechselwirkungen werden zuvor ausser Kraft gesetzt. Die im Gange befindliche Strukturaufklärung hat allerdings eine Heterogenität des Glycophorins ans Licht gebracht (38), die nicht auf der bei Glykoproteinen bekannten Mikroheterogenität im Kohlenhydratanteil beruht (52,53), sondern in der N-terminalen Hälfte des Proteins lokalisiert ist.

Etwa 5% des gesamten Membranproteins der Erythrozyten entfallen auf das Enzym Glycerinaldehyd-3P-Dehydrogenase. Es läßt sich mit Salzlösungen hoher Ionenstärke (25,54) aus der Membran extrahieren. Das Enzym ist ein basisches Protein, dessen Quartärstruktur durch Zusammenlagerung von vier Untereinheiten entsteht. Es ist per definitionem zu den peripheren Membranproteinen zu rechnen (26,28,55). Jedoch wurde die Bindung des Enzyms an die Membran der intakten Zelle inzwischen in Frage gestellt (29).

Eine Vielzahl weiterer Enzyme ist in der Erythrozytenmembran gefunden worden, so eine Phosphoprotein-Phosphohydrolase (56), mehrere ATPasen (15, 56,57), eine Adenylatkinase (56), eine cAMP-abhängige Proteinkinase und eine Acetylcholinesterase (59,60). Für manche der Membranenzyme gibt es Angaben zur Topographie (61); außerdem sind Bindungen und

Faktoren untersucht worden, welche die Aktivität von Membranenzymen beeinflussen (15,61-63). Die Zuordnung der in der Membran lokalisierten enzymatischen Funktionen zu bestimmten Membranproteinen, bzw. deren Isolierung erweist sich als sehr schwierig und bleibt vorerst die Ausnahme.

Damit kann zusammenfassend festgestellt werden: Aus der großen Anzahl der in der Erythrozytenmembran vorkommenden Proteine konnten bislang nur drei isoliert und näher charakterisiert werden. Von diesen wird nur die periphere Glycerinaldehyd-3P-Dehydrogenase den strengen Kriterien der Reinheit gerecht. Spectrin und das integrierte Protein Glycophorin sind dagegen heterogen.

Das heißt, der überwiegende Anteil der Membranproteine - und dabei mit Ausnahme des Glycophorins die Gesamtheit der integrierten Membranproteine - konnte bislang nicht näher mit den Methoden der Proteinchemie charakterisiert werden. Ansätze in dieser Richtung wurden unternommen (31,64-66), führten aber zum Teil zu widersprüchlichen Aussagen.

1.2 Lösungsverhalten der Membranproteine von Erythrozyten

Eine Untersuchung des Lösungsverhaltens von Membranproteinen hat zur Voraussetzung, daß festgelegt, bzw. definiert wird, wann von einer vollständigen Lösung gesprochen werden kann. So einleuchtend das klingt, so wenig ist anfangs darauf geachtet worden (67) - und viele Vergleiche verschiedener Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelsysteme bezüglich der "Lösung" von Membranproteinen leiten irre, weil von verschiedenen Voraussetzungen ausgegangen wird.

Inzwischen gilt als Kriterium vollständiger Lösung die Feststellung, ob nach einstündiger Zentrifugation bei mindestens 100 000 x g aus der zu prüfenden Lösung Lösungsbestandteile sedimentieren oder nicht. Weitere Kriterien vollständiger Lösung sind bei RAZIN (68) zusammengefaßt.

Bedingt durch verschiedene Zielsetzung, erfolgte die Untersuchung des Löslichkeitsverhaltens von Membranproteinen auf zum Teil sehr unterschiedliche Weise. Grundsätzlich stellt man den Effekt eines bestimmten Lösungsmittels fest, indem man prüft, welcher Anteil an Membranproteinen damit in Lösung gebracht werden konnte, aus welchen Komponenten der gelöste Teil besteht und zu welchem Prozentsatz die einzelnen Komponenten in Lösung gebracht wurden: Das heißt, man untersucht die Komplementarität von gelöstem Anteil und Lösungsrückstand.

Bei den auf Membranproteine angewandten Lösungsmitteln kann man im wesentlichen drei Gruppen unterscheiden (vgl. hierzu auch 69):

- I. Wäßrige Lösungsmittel
- II. Organische Lösungsmittel
- III. Detergentien-haltige Lösungsmittel

Folgendes kann über die einzelnen Gruppen von Lösungsmitteln und Lösungsmittelsystemen ausgesagt werden.

Gruppe I: Wäßrige Lösungsmittel

Durch Veränderungen der Ionenstärke, des pH, sowie durch Anwendung von Chelatbildnern lassen sich bis zu 50% der Membranproteine in Lösung bringen (57,64, 60-73).

Es handelt sich dabei ausschließlich um periphere Membranproteine; kein integriertes Membranprotein ist unter diesen Bedingungen löslich (s. auch Abb.1). (Es sei daran erinnert, daß gerade die Erythrozytenmembran einen ganz erheblichen Anteil an peripheren Proteinen aufweist). Wird eine über 50 proz. Löslichkeit durch Lösungsmittelsysteme der Gruppe I berichtet (vgl.72), so ist entweder das Kriterium der vollständigen Lösung nicht beachtet worden oder die gelösten "Proteine" trugen noch einen erheblichen Anteil an assoziierten Phospholipiden. Die Anwendung von hochmolaren Harnstoff- und Guanidin-HCl-Lösungen ergab unspezifische Effekte (74,75).

Die Versuche, Membranproteine durch Succinylierung (76,77) bzw. Maleylierung (77) in eine wasserlösliche Form zu überführen, gehören zwar nicht von vornherein in diese Gruppe, sollen aber hier nicht unerwähnt bleiben.

Gruppe II: Organische Lösungsmittel

Butanol (78), 2-Chloräthanol-Wasser (9/1) bei stark saurem pH (79), 90 proz. Essigsäure (80), Phenol-Eisessig-Wasser (75,81-83), Butanol-Eisessig-Wasser (75), sowie Pyridin-Wasser (84) repräsentieren eine Auswahl häufig angewandter organischer Lösungsmittelsysteme.

Diese Gemische ermöglichen eine partielle Lösung integrierter Membranproteine. Sehr viele Membranproteine bilden jedoch zum Teil irreversible Aggregate, nachdem sie der Behandlung durch organische Lösungsmittel ausgesetzt waren.

Gruppe III: Detergentien-haltige Lösungsmittel

Man unterscheidet ionische und nicht-ionische Detergentien. Das am häufigsten verwendete nicht-ionische Detergens ist Triton-X-100 (85,86). Unter den ionischen Detergentien kommt dem Natriumdesoxycholat (87) kaum, dem Natriumdodecylsulfat (15,24,88) (gebräuchliche englische Abkürzung: SDS), jedoch größte Bedeutung zu. Mit Hilfe dieser Detergentien können vor allem auch integrierte Membranproteine in Lösung gebracht werden.

In einer neueren Arbeit untersuchten KIRKPATRICK et al. (89) die Wirkungsmechanismen von Triton-X-100, Natriumdesoxycholat und SDS und verglichen das Ausmaß der Lösung der verschiedenen Membrankomponenten in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Detergens. Wichtigstes Ergebnis in dem hier interessierenden Zusammenhang war die Feststellung, daß nur SDS in der Lage ist, alle integrierten Membranproteine und Membranlipide vollständig und getrennt voneinander in Lösung zu halten.

Es war das Ziel dieser Arbeit, eine Trennmethode hoher analytischer Auflösung für Membranproteine zu entwickeln, mit der Grundforderung nach Lösung aller Proteine. Eine Überprüfung der aufgeführten Lösungsmittelsysteme auf diese Forderung hin zeigte, daß nur das ionische Detergens SDS diese Bedingung erfüllt.

Mit dem Lösungsmittelsystem Phenol-Eisessig-Wasser kann dagegen keine völlige Lösung aller Membranproteine erhalten werden. Es schien jedoch möglich, dies durch Modifizierung des Lösungsmittelsystems zu erreichen (s.S.17).

1.3 Trennung von Membranproteinen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine sind dann voneinander verschieden, wenn sie sich in ihrer Primärstruktur, das heißt in ihrer Aminosäuresequenz, unterscheiden. Zahl und Art der in einem Protein vorhandenen Aminosäuren bestimmen Molekülgröße, Ladungszustand und Konformation in einem vorgegebenen äußeren Milieu; das Zusammentreten einer diskreten Anzahl von Untereinheiten zu einer Funktionseinheit ist möglich. Damit sind die Parameter genannt, die in alle physikalisch-chemischen Trennmethode von Proteinen als entscheidende Größen eingehen: Molekülgröße, Molekülform und Ladungszustand. Auf den Einfluß vorhandener oder gewählter äußerer Bedingungen auf diese Größen wird hier nicht eingegangen.

Ziel jeder analytischen Trennmethode ist eine optimale Auflösung der an der Trennung teilnehmenden Komponenten. Die Komplexität des Ausgangsgemisches und das Lösungsverhalten der beteiligten Komponenten sind der Ausgangspunkt für die Auswahl der anwendbaren Trennverfahren und geben einen ersten Hinweis, auf welchem Wege eine optimale Auflösung der zu trennenden Komponenten erreicht werden kann.

Bei der Aufgabe, ein Trennverfahren hoher Auflösung für die Proteine der Zytoplasmamembran menschlicher Erythrozyten zu entwickeln, mußte die Grundforderung beachtet werden, daß alle Membranproteine an der Trennung teilnehmen sollen. Bisherige Untersuchungen (vgl. 25, 54, 90) ergaben, daß die Membranproteine menschlicher Erythrozyten ein sehr komplexes Gemisch mit Molekulargewichten von ca. 20 000 bis 200 000 darstellen. Sie zeigen sehr starke Unterschiede in ihrem physikalisch-chemischen Verhalten. Die prozentuale Beteiligung der einzelnen Komponenten am Aufbau der Membran variiert in hohem Maße.

Die Trennung eines so komplexen Proteingemisches wird am ehesten bei optimaler Ausnutzung der Parameter Molekülgröße, Molekülform und Nettoladung der gelösten Komponenten gelingen. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) bot sich als ein hierfür geeignetes Verfahren an.

Bei dieser Methode werden die Proteine in einem elektrischen Feld nach Maßgabe ihrer Nettoladung, Molekülgröße und Molekülform getrennt, da als Träger ein Gel dient, dessen Poren von den Molekülen während der Wanderung passiert werden müssen. Die Wahl der Porengröße liegt in der Hand des Experimentators. Gleichzeitig erfolgt eine Konzentrierung der einzelnen Komponenten des aufgetragenen Gemisches, die sich auf verschiedene Weise erreichen läßt.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS (SDS-PAGE) und die isoelektrische Fokussierung (iF) sind Sonderformen der Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

SDS-PAGE: Durch Anlagerung von SDS wird die Eigenladung der Proteine kaschiert, die Proteine erhalten eine einheitlich negative Ladung. Die elektrophoretische Beweglichkeit so behandelter Proteine in der Gelelektrophorese ist nunmehr eine Funktion der Molekülgröße.

iF: Es handelt sich hierbei um den Spezialfall einer in der Endphase "stationären Elektrophorese". Die aufzutrennenden Substanzen wandern dabei zunächst in einem pH-Gradienten, der durch den elektrischen Strom selbst aufgebaut wird, bis sie zu dem Ort kommen, dessen pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entspricht. Hier bleiben sie liegen, da ihre Nettoladung Null beträgt (91).

Auf Einzelheiten der PAGE wird im folgenden nur insoweit eingegangen, als sie in unmittelbarem Zusammenhang mit der dargestellten Methode stehen. Einige umfassendere Darstellungen der Theorie (92-94) und Praxis der PAGE (91,95-99) seien hier nur am Rande erwähnt. Die Auswahl innerhalb der vielfältigen Verfahren der PAGE wird durch die Forderung nach Lösung aller Membranproteine erheblich eingeengt.

Die Möglichkeit, die Vorteile der PAGE, nämlich Unterschiede der Proteine in Molekülgröße, Molekülform und Nettoladung in einem Trennschritt zu nutzen, erscheint nur unter der Voraussetzung gegeben, daß eine befriedigende Lösung der Membranproteine in einem modifizierten Phenol-Eisessig-Wasser-System gelingt und ein hierzu geeignetes System der PAGE entwickelt werden kann.

Die durch SDS erreichte vollständige Lösung aller Membranproteine legt von vornherein auf die Sonderform der SDS-PAGE fest, wodurch der Parameter Nettoladung geopfert wird und nicht mehr für die Trennung genutzt werden kann.

Eine Anwendung der isoelektrischen Fokussierung scheitert am Lösungsverhalten der Membranproteine. Lösungsmittel, die eine spätere iF ermöglichen, sind nicht in der Lage, alle Membranproteine zu lösen. Wird ein Lösungsmittelsystem angewandt, das alle Membranproteine löst, so sind die Vorausbedingungen für eine iF nicht mehr gegeben. MERZ et al. (100) berichteten 1972 über eine Trennung von Membrankomponenten durch iF; jedoch erfüllt das dort angewandte "Lösungsmittelsystem" 8 M Harnstoff, 0,02 M EDTA, 0,02% β -Mercaptoäthanol nicht einmal teilweise die Mindestforderung zur Lösung von Membranproteinen. Die Ausgangssituation der

Trennung (iF) ist damit unüberschaubar und eine sichere Interpretation der Ergebnisse wird fraglich, wenn nicht unmöglich.

Damit standen für die weitere Arbeit zwei Wege fest:

1. Modifizierung des Lösungsmittelsystems Phenol-Eisessig-Wasser und Entwicklung eines hierzu passenden Verfahrens der PAGE, das ggf. mit einem weiteren Trennschritt kombiniert werden könnte.
2. Entwicklung eines geeigneten Verfahrens der SDS-PAGE. Im Bewußtsein des Nachteils einer ausschließlichen Trennung nach Molekülgröße in der SDS-PAGE soll folgende Modellvorstellung auf ihre Durchführbarkeit überprüft werden: Die SDS-PAGE wird als ein erster Trennschritt verwendet, mit dem ein zweiter Trennschritt (mit anderem Trennprinzip) mit dem Ziel einer erhöhten analytischen Auflösung kombiniert wird.

Ein Gelingen beider Vorhaben würde einen Vergleich der Trennergebnisse beider Methoden ermöglichen und somit gute Gewähr für die Vermeidung von Fehlinterpretationen der erhaltenen Resultate bieten.

1.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen in einem Essigsäure-Harnstoff-System unter Verwendung von Phenol-Eisessig-Wasser als Lösungsmittel.

Die Verwendung von Phenol in stark saurer Lösung zur Extraktion, Lösung und Trennung von Proteinen ist bekannt (101,102). Eine Anwendung auf Proteine der Mitochondrienmembran erfolgte 1965 durch TAKAYAMA et al. mit einem Phenol-Eisessig-Wasser (2/1/1;w/v/v) - System (83), das inzwischen in modifizierter Form

zur Lösung von Membranproteinen der Leberzelle versucht wurde (81,82).

Phenol ist eines der am stärksten disaggregierenden Lösungsmittel (103). Die Wirkung der Essigsäure in Lösungsmittelsystemen ist eine Funktion ihrer Konzentration. Während 10 proz. Essigsäure Beispiel einer schwachen Säure ist, kann konzentrierte Essigsäure ($\geq 50\%$) grob gesprochen als organisches Lösungsmittel aufgefaßt werden (80).

In der Ausnutzung dieser Eigenschaften von Phenol und Essigsäure liegt die Basis des hier zu entwickelnden Lösungsmittelsystems. EDTA zum Abfangen freigesetzter, divalenter Kationen, Dithioerythritol (DTE) zur Spaltung von Disulfidbrücken kommen hinzu. Auf die Anwendung von Harnstoff wurde verzichtet, da selbst 8M Harnstofflösungen weder native noch rekonstituierte Membranen zu disaggregieren vermögen (68).

Im wesentlichen wurden folgende Mischungsverhältnisse von Phenol-Eisessig-Wasser verwendet:

Phenol-Eisessig-Wasser (2/1/1;w/v/v)

Phenol-Eisessig-Wasser (1/1/1;w/v/v)

Phenol-Eisessig-Wasser (3/6/1;w/v/v)

Der Wasseranteil wurde dabei durch die Membransuspension geliefert, die zusätzlich EDTA und DTE zu einer Endkonzentration von 5mM bzw. 40 mM enthielt. Die Endkonzentration an Protein betrug 0,2-1 mg/ml.

Eine vollständige Lösung wurde in keinem Falle erreicht. Dennoch wurde eine Analyse durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese angeschlossen. (Zur Technik der PAGE s.S.34). Hierzu wurde zunächst das von TAKAYAMA et al. beschriebene System verwendet (83):

Es wurden damit günstige Spannungs- und Stromstärkewerte erreicht. Nach Auftragen der Probe auf das Gel fielen jedoch Lösungsbestandteile aus. Das Gel war zu dicht; nur wenige Proteine konnten während der Elektrophorese in das Gel einwandern. Die erreichte Auflösung war gering.

Um ein Ausfallen von Lösungsbestandteilen der Probe zu vermeiden, wurde nun zuerst eine Lösung von 30% Phenol, 5% Essigsäure, 40 mM DTE und 5mM EDTA auf das Gel gebracht und die Probe dieser Lösung unterschichtet. Die Anwendung dieser Lösung hatte aber eine Beschädigung der Geloberfläche im Verlaufe der Elektrophorese zur Folge. Der Acrylamidgehalt wurde von 7,5 auf 5% reduziert, das Acrylamid/BIS-Verhältnis von 37,5 auf 40 erhöht. Die Harnstoffkonzentration im Gel wurde von 5M auf 2M gesenkt.

Die 35 proz. Essigsäurelösung im Gel und die 10 proz. Essigsäurelösung als Elektrodenpuffer wurden beibehalten, da Versuche mit anderen gepufferten sauren Systemen wie Glycin-HCl und Citrat-HCl keine Verbesserung ergaben.

Eine Inkorporation von Phenol in das Gel gelang nicht, da Phenol mit Acrylamid zu β -Aryloxy- oder Alkoxypropionamiden reagiert (98).

"Lösen" der Membranen mit Phenol-Eisessig-Wasser (2/1/1;w/v/v) in Gegenwart von 40 mM DTE und 5 mM EDTA, bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml und nachfolgende Elektrophorese in dem oben angeführten modifizierten "TAKAYAMA-System" erbrachten das beste Ergebnis. Es ist in Abb.2 schematisch wiedergegeben.



Abb.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen in einem Essigsäure-Harnstoff-System. (Schematische Darstellung). Die unvollständige Lösung durch Phenol-Eisessig-Wasser (2/1/1;w/v/v) wird deutlich sichtbar: Ein beträchtlicher Anteil aggregierten Proteins bleibt am Gelbeginn liegen (Pfeil) und nimmt nicht an der Trennung teil.

Zusammenfassend läßt sich hier feststellen: Die untersuchten Phenol-Eisessig-Wasser-Lösungsmittelsysteme ermöglichen keine vollständige Lösung der Membran. (Anm.: In sauren Systemen besteht zudem die erhöhte Gefahr einer endogenen Proteasewirkung (104)). Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem Essigsäure-Harnstoff-System wandern nicht alle Bestandteile der "Proteinlösung" ein; das Auflösungsvermögen der Methode ist gering.

Die Grundforderungen nach Lösung aller Membranproteine und anschließender Trennung in einem System hoher analytischer Auflösung waren damit nicht erfüllt.

1.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat

Zum besseren Verständnis der Bedeutung des Natriumdodecylsulfats (SDS) für den Lösungsvorgang der Membranproteine und für deren Trennung durch SDS-Gelelektrophorese ist es notwendig, zunächst einige Fragen näher zu erläutern:

Die Bindung von SDS an Proteine

Das Prinzip der SDS-PAGE

Die Bindung von SDS an Proteine ist vor allem von TANFORD untersucht worden. Er schreibt (frei übersetzt nach (4)):

Die kooperative Ausbildung von stöchiometrischen Komplexen zwischen Serumalbumin und Dodecylsulfat, die eine große Anzahl gebundener Liganden enthalten, wurde zuerst von PUTNAM und NEURATH erkannt (105). Es wurde gezeigt (für SDS), daß diese Art von Komplexen mit allen Proteinen gebildet werden kann und daß die maximale Menge an Liganden, die pro Gramm Protein gebunden werden kann, für alle gleich ist (62,106). Für Proteine ohne Disulfidbrücken oder mit reduzierten Disulfidbrücken, sofern ursprünglich welche vorhanden waren, sind zwei Arten eines Komplexes möglich, eine, die 0,4 g SDS pro Gramm Protein enthält (1 Molekül Detergens auf 7 Aminosäurereste) und eine andere, die 1,4 g SDS pro g Protein enthält (1 Molekül Detergens pro 2 Aminosäurereste). Der Übergang zwischen diesen beiden findet bei $6-7 \times 10^{-4} \text{ M}$ SDS (bei 25°C , pH 5,6-7,2) statt und zeigt geringe Abhängigkeit von der Ionenstärke. Alle Proteine werden in ihre zugrundeliegenden Polypeptidketten disaggregiert und jede Kette bildet einen individuellen, asymmetrischen Partikel, der etwa Stäbchenform hat und dessen Länge grob dem Molekulargewicht proportional ist (107). Ergebnisse, die für Proteine mit intakten Disulfidbrücken erhalten wurden, zeigen an, daß sehr ähnliche Komplexe gebildet werden, die lediglich sterische Einschränkungen durch die Disulfidbrücken erfahren. Die Menge an gebundenem Detergens ist in diesem Fall erniedrigt und der resultierende Komplex ist nicht so ausgestreckt (108). Allgemein läßt sich sagen: Die Veränderungen in der Proteinkonformation, die durch Detergentien induziert werden, ereignen sich bei sehr niedrigen Konzentrationen an Detergens. Daraus geht hervor, daß die Wechselwirkung mit dem Protein sehr stark sein muß.

Zum Prinzip der SDS-Elektrophorese bemerkt TANFORD (4): Die Polypeptidketten können voneinander und von den lipidhaltigen Mizellen durch die empfindliche Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt werden. Die elektrophoretische Beweglichkeit eines jeden Komplexes ist ein Maß des Molekulargewichtes der zugrundeliegenden Polypeptidkette. Auf diese Weise läßt sich eine reproduzierbare Analyse des Gehaltes an Polypeptidketten jeder beliebigen Membran leicht und schnell erreichen. Es sollte jedoch beachtet werden, daß Glykoproteine mit großen Kohlenhydratanteilen in diesem System anomale Beweglichkeiten zeigen werden, da sie Partikel ausbilden, in welchen sich die Polysaccharidketten seitwärts von den Protein-Detergens-Stäbchen erstrecken werden - mit einer nachfolgenden Erhöhung des Stokes'-Radius. Stark saure oder basische Proteine können sich ebenso anomal verhalten, weil ihre hohe Ladungsdichte die elektrophoretische Beweglichkeit direkt oder über eine Veränderung der Menge an gebundenem Detergens beeinflussen kann.

Die Anwendbarkeit der SDS-PAGE als Trennverfahren für die Proteine von Plasmamembranen wurde bereits mehrfach gezeigt (25,54,90,215). In eigenen Untersuchungen an der menschlichen Erythrozytenmembran konnte dies bestätigt werden.

Bei diesen Versuchen wurden einer Membransuspension (2-3 mg Protein/ml) SDS (35 mM), DTE (40 mM) und Natriumphosphatpuffer, pH 7,1 (50 mM), zu den in Klammern angegebenen Endkonzentrationen zugemischt. Die so erhaltene Lösung konnte ohne weitere Vorbehandlung der Elektrophorese unterworfen werden. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte in einem nach WEBER und OSBORN (117) modifizierten, kontinuierlichen 0,05 M Natriumphosphatsystem, pH 7,1.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Nach Zugabe von SDS zur Membransuspension wird eine vollständige Lösung der Erythrozytenmembran erreicht. Bei der nachfolgenden Gelelektrophorese wandern alle Proteine in das Gel ein. Die Phospholipide interferieren bei der Trennung der Membranproteine nicht (109). Eine Lipid-

extraktion vor der Elektrophorese ist damit überflüssig, das heißt, die dabei immer eintretenden und schwer überschaubaren Verluste an Membranproteinen (vor allem Glykoproteinen) können umgangen werden. Damit können alle Membranproteine ohne Verlust der elektrophoretischen Trennung unterworfen werden. Die mit der SDS-PAGE erreichte Auflösung ist befriedigend; der Grad dieser Auflösung bleibt jedoch von vornherein eingeengt, da hierbei nur nach Maßgabe der Molekülgröße getrennt wird. Damit müssen folgende Ursachen für eine unvollständige Trennung in Erwägung gezogen werden:

- a) Geringe Unterschiede in den Molekulargewichten und andere Faktoren, wie großer Kohlenhydratanteil, stark basische und stark saure Ladung im Molekül (4), können zu Überlagerung, zur "identischen" Wanderung von Proteinen führen.
- b) Zwischen den einzelnen Proteinen der Erythrozytenmembran bestehen große quantitative Unterschiede. Liegen intensive und sehr schwache Banden in enger Nachbarschaft zueinander, kann eine Unterscheidung unmöglich werden.

Es war somit notwendig, eine weitere Trennung anzuschließen, mit dem Ziel, die bisher erreichte Auflösung zu steigern. Dabei erschien es sinnvoll, sich die sehr guten Lösungseigenschaften von SDS auch weiterhin zunutze zu machen und eine Verbesserung der Auflösung durch Erweiterung der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu einer Methode der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese anzustreben.

1.4 Entwicklung einer Methode der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen

1.4.1 Prinzip der Methode. Vorversuche

Sogenannte 2-dimensionale Methoden finden bevorzugt dort Anwendung, wo es darum geht, die Komponenten eines sehr komplexen Ausgangsgemisches qualitativ und auch quantitativ zu erfassen.

Das Prinzip der 2-dimensionalen Verfahren läßt sich unter Zuhilfenahme eines rechtwinkligen Koordinatensystems erläutern:

Das zu trennende Gemisch wird im Schnittpunkt von Abszisse und Ordinate aufgetragen. Es folgt eine erste Auftrennung des Gemisches in eine bestimmte Anzahl verschiedener Fraktionen entlang der X-Achse (Trennsystem I). Diese aus der ersten Trennung erhaltenen Fraktionen bilden nun gleichsam die Startlinien für eine sich unmittelbar anschließende zweite Auftrennung in Y-Richtung (Trennsystem II). Die Fraktionen, die nach dem ersten Trennschritt noch heterogen waren, werden dabei in ihre konstituierenden Komponenten aufgetrennt.

Die hohe Auflösung 2-dimensionaler Verfahren läßt sich jedoch nur erreichen, wenn es gelingt, zwei Systeme (Trennsysteme I und II) zu finden, welche die folgenden Bedingungen erfüllen:

1. In Trennsystem I und II müssen jeweils verschiedene Moleküleigenschaften (Trennparameter) der untersuchten Stoffklasse für die Trennung maßgebend verantwortlich sein.
2. Die beiden Trennsysteme müssen sich zu einem zweidimensionalen Verfahren kombinieren lassen.

Zweidimensionale Trennmethode für komplexe Proteingemische, wie Serumproteine (111,112), ribosomale Proteine (113) und Proteine der Kernmembran (114), sind entwickelt worden. Die dabei angewandten Trennsysteme lassen sich jedoch nicht auf die Trennung aller Proteine von Zytoplasmamembranen übertragen.

Grundsätzlich ist die Vielfalt an Trennsystemen, die sich ihrem Prinzip nach unterscheiden, innerhalb einer Stoffklasse durch die Anzahl der Trennparameter dieser Stoffklasse begrenzt. Die Trennparameter der Proteine sind - wie bereits auf S.14 ausführlich dargestellt: Molekülgröße, Molekülform, Nettoladung und isoelektrischer Punkt (pI). Für die Proteine der Erythrozytenmembran konnte indessen nur die SDS-PAGE als hinreichend geeignetes Trennsystem akzeptiert werden. Da die dabei erreichte Auflösung jedoch nicht befriedigt, war eine Erweiterung der SDS-PAGE zu einer Methode der 2-dimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) notwendig. Unter Beachtung der oben angeführten Bedingungen läßt sich diese Aufgabe so formulieren: Die SDS-PAGE stellt das Trennsystem I dar. Maßgeblich verantwortlich für die hiermit erreichte Trennung ist der Parameter Molekülgröße. Infolge der SDS-induzierten Proteindenaturierung und der Ausbildung stäbchenförmiger, negativ geladener SDS-Proteinkomplexe kommen die Parameter Molekülgestalt, Nettoladung und pI nicht zur Auswirkung. Vereinfacht ausgedrückt wird im Trennsystem I (SDS-PAGE) nur nach Unterschieden in der Molekülgröße getrennt. Da eine isoelektrische Fokussierung im Anschluß an eine SDS-Elektrophorese nicht möglich ist, stehen noch die Trennparameter Molekülgestalt und Nettoladung für eine Anwendung im Trennsystem II zur Verfügung.

Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung eines zweiten Trennsystems ist, die Zerstörung der vorliegenden Mizellaren SDS-Proteinkomplexe, da erst nach der Entfernung des proteingebundenen SDS die ursprünglich unterschiedliche Nettoladung der einzelnen Proteine wieder zum Vorschein kommen kann und erst dann eine Ausbildung unterschiedlicher Molekülformen möglich wird. Wie das Trennsystem II letztlich aussehen mag - ob dabei einer dieser beiden Parameter bevorzugt oder ob beide mit unterschiedlichem Anteil zur Trennung eingesetzt werden - bleibt zunächst von nachgeordneter Bedeutung. Das "Wie" der SDS-Entfernung ist die vor- dringliche Frage.

Alle bekannten Verfahren zur Entfernung von proteingebundenem SDS, wie Dialyse, Sephadex-Gel- filtration (68), sowie Ionenaustausch-Chromatographie (115) gehen von wäßrigen SDS-haltigen Proteinlösungen aus. Die vorgesehene Verwendung der SDS-PAGE als erster Trennschritt einer 2-dimensionalen Methode ergibt jedoch ganz andere Verhältnisse hinsichtlich der notwendigen Entfernung von proteingebundenem SDS im Anschluß an die SDS-PAGE. Denn folgende Punkte müssen dabei berücksichtigt werden:

1. Die SDS-Proteinkomplexe befinden sich nicht frei in Lösung, sondern in einzelne Fraktionen aufgetrennt in einem Träger, dem Polyacrylamid-Gel.
2. Diese durch SDS-PAGE erreichte Trennung in Proteinfractionen muß aufrecht erhalten bleiben, da sie Ausgangspunkt der nachfolgenden Trennung ist.
3. Der zur SDS-Entfernung nötige Zeitbedarf muß möglichst gering gehalten werden, um die Diffusion der im SDS-Gel eingeschlossenen Proteinfractionen auf ein Minimum zu beschränken.

Eine einfache Möglichkeit der Entfernung von proteingebundenem SDS bot sich an: Die elektrophoretische Entfernung des ionischen Detergens mit Hilfe eines starken elektrischen Feldes, das in der Initialphase des zweiten Trennschritts erzeugt wird. Es wurde daher ein 2-dimensionales Trennsystem erprobt, in dem dieses Konzept verwirklicht wurde. Es ist in seinen wesentlichen Elementen schematisch in Abb.3 wiedergegeben.

Die Technik 2-dimensionaler Elektrophoresen wird auf S. 39 ausführlich dargestellt; hier soll das Prinzip zur besseren Vorstellbarkeit kurz erläutert werden.

Eine Probe gelöster Membranen wird auf ein zylindrisches Polyacrylamid-Gel (1D-Gel) aufgetragen und durch SDS-PAGE fraktioniert (1.Dimension). Nach Beendigung der SDS-PAGE wird das 1D-Gel auf eine vertikal ausgerichtete Platte aus Polyacrylamidgel (2D-Gel) aufpolymerisiert und dient so als horizontales "Startgel" für die nachfolgende SDS-freie PAGE in der 2.Dimension.

Abb.4 zeigt das Ergebnis einer 2D-PAGE nach den Bedingungen, wie sie in Abb.3 wiedergegeben sind. Man erkennt, daß die einzelnen Fraktionen des horizontal liegenden 1D-Gels in unterschiedlichem Ausmaße in das 2D-Gel eingewandert sind. Die Heterogenität bestimmter Fraktionen ist nach der Trennung in der 2. Dimension bereits deutlich sichtbar (beachte vor allem die Aufsplitterung der B1-Fraktion in mindestens 5 Komponenten. Zur Bezeichnung der Fraktionen s.S.46).

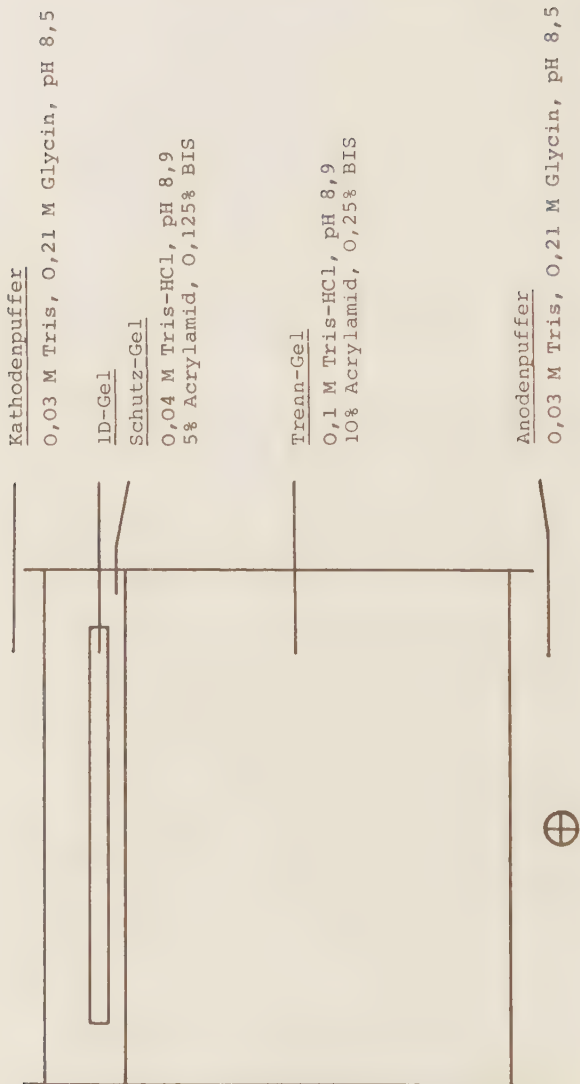


Abb. 3 Schematische Darstellung des Trennsystems der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Angabe der Endkonzentrationen der verwendeten Lösungen. (Trenn-Gel der 2. Dimension: 10% Acrylamid). Das Anodenende des 1D-Gels zeigt nach rechts. Weitere Erläuterung s. Text (S.27).



Abb. 4 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen. Bedingungen der Elektrophorese wie in Abb. 3 angegeben. Trenn-Gel der 2. Dimension ist ein 10 proz. Polyacrylamid-Gel. Das 10-Gel ist in ein Schutz-Gel einpolymerisiert. Der Pfeil zeigt die Position der B1-Fraktion. Weitere Erläuterung s. Text (S. 27).

Dieses Ergebnis zeigt, daß das entwickelte Konzept einer 2D-PAGE von Membranproteinen praktisch durchführbar ist. Jedoch weist das System in der vorliegenden Form noch zwei große Mängel auf:

1. Ein beträchtlicher Anteil mancher Fraktionen (bspw. A1, A2) bleibt im 1D-Gel liegen und nimmt nicht an der Trennung in der zweiten Dimension teil.
2. Manche Fraktionen wandern zwar aus dem 1D-Gel aus und ins 2D-Gel ein, bleiben dort aber bald liegen (vgl. C8) und nehmen somit ebenfalls nicht an der Trennung in der 2. Dimension teil.

Die Behebung dieser Mängel wurde durch folgende Änderungen der zweiten Dimension versucht (Abb. 5):

1. Das 1D-Gel wurde so aufpolymerisiert, daß es nur noch an seiner Unterseite und an den beiden Seitenflächen von Vor-Gel umgeben ist. Die Oberseite des 1D-Gels blieb frei von Gel und stand damit in direktem Kontakt zum Schutzpuffer.
2. Das 10%-Gel der 2. Dimension wurde durch einen stufenförmigen Polyacrylamid-Gelgradienten ersetzt.

Das Ergebnis dieser Änderung zeigt die Abb. 6. Alle Fraktionen des 1D-Gels nahmen quantitativ an der Trennung in der 2. Dimension teil. Am Beginn des 2D-Gels blieben keine Komponenten liegen. Am oberen Bildrand ist die Tasche im Vor-Gel zu erkennen, die zur Aufnahme des 1D-Gels diente: Die Oberseite des 1D-Gels wurde nicht mehr vom Vor-Gel bedeckt.

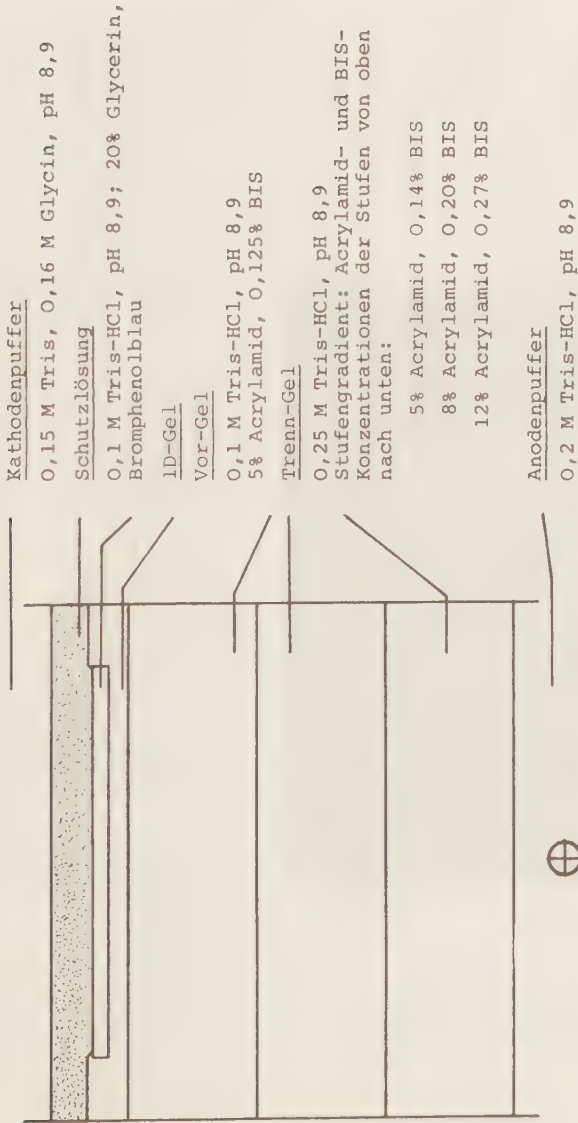


Abb. 5 Schematische Darstellung des Trennsystems der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Angabe der Endkonzentrationen der verwendeten Lösungen. (Trenn-Gel der 2. Dimension: Stufengradient, 5, 8, 12% Acrylamid). Das Anodenende des 1D-Gels zeigt nach rechts. Weitere Erläuterung s. Text (S.30).

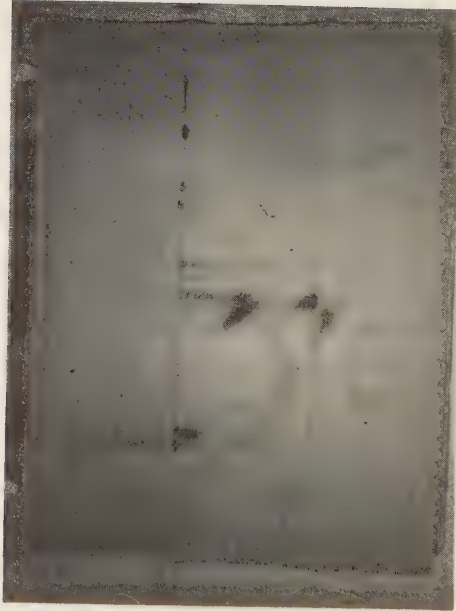


Abb. 6 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen. Bedingungen der Elektrophorese wie in Abb. 5 angegeben. Trenn-Gel der 2. Dimension ist ein stufenförmiger Polyacrylamid-Gelgradient (5, 8, 12% Acrylamid). Das Schutz-Gel ist durch eine Kombination von Vor-Gel und Schutzlösung ersetzt. Das hier abgebildete 1D-Gel hat nicht an einer zweidimensionalen Trennung teilgenommen. Es handelt sich um ein parallel gelaufenes 1D-Gel, das zur Demonstration der am Ende der 1D-Elektrophorese vorliegenden Trennung dient. Weitere Erläuterung s. Text (S. 30).

Damit waren die auf S.30 festgestellten Mängel behoben. Der in der 2.Dimension verwendete Stufengradient zeigte zugleich den für eine Trennung anwendbaren Konzentrationsbereich an Acrylamid: Ein 5 proz. Gel gestattet das Einwandern aller Fraktionen in das 2D-Gel. Die größte Auflösung wird bei einer Acrylamid-Konzentration von 8% erhalten; die schnellsten Komponenten erreichen den Gelbereich mit einer Acrylamid-Konzentration von 12%. Von einem Austausch des Stufengradienten gegen einen kontinuierlichen, linearen Polyacrylamid-Gelgradienten in dem oben ermittelten Konzentrationsbereich des Acrylamids war daher eine weitere Verbesserung der Auflösung in der 2.Dimension zu erwarten. Parallel hierzu liefen Versuche zur Optimierung auch aller anderen Schritte innerhalb des zweidimensionalen Trennverfahrens.

1.4.2 Optimierung der Methode

Die Versuche zur Optimierung der Membranlösung und der Bedingungen für die 1D- und 2D-Elektrophorese werden nicht gesondert beschrieben. Das Ergebnis dieser Entwicklungen wird in den nächsten Abschnitten in Form einer Arbeitsvorschrift und einer schematischen Darstellung wiedergegeben. In diesem Zusammenhang gemachte Beobachtungen und Feststellungen von allgemeiner Bedeutung werden am Ende eines jeden Abschnitts diskutiert.

1.4.2.1 Lösen der Membranen

Die Membranen werden nach folgender Vorschrift gelöst: Zu 0,2 ml Membransuspension (Proteinkonzentration 2-4 mg/ml) werden gegeben:

25 μ l 0,25 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,1

40 μ l 20% SDS

10 μ l 0,1 M EDTA

5 μ l β -Mercaptoäthanol

Nach 40-minütiger Inkubation bei 37°C werden 0,22 ml 40 proz. Glycerin (v/v) und eine Spur Pyronin G zugegeben. (Die Endkonzentrationen der Lösungsbestandteile sind in Abb.7 angegeben).

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde DTE durch β -Mercaptoäthanol ersetzt, da β -Mercaptoäthanol bei Membranproteinen stärker reduzierende Eigenschaften zeigt als DTE (88). Die Inkubation bei 37°C schafft allgemein bessere Lösungsbedingungen und erhöht die Reduktionswirkung von β -Mercaptoäthanol.

1.4.2.2 Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Herstellung der Gele für die erste Dimension (1D-Gele)

Die Elektrophorese in der 1. Dimension wird in Glasröhrchen von 13 cm Höhe und 0,5 cm Innendurchmesser durchgeführt. Diese waren zuvor in Chromschwefelsäure gereinigt worden. Die Röhrchen werden bis zu einer Höhe von 11 cm mit 1D-Gellösung (s. unten) gefüllt und anschließend mit einer Lösung von 0,1% SDS, 0,05% Ammoniumpersulfat, 0,01% N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED) überschichtet. Die Polymerisation erfolgt bei Zimmertemperatur in ungefähr einer Stunde. Die Gele bleiben vor dem Gebrauch mindestens über Nacht stehen.

Zur Herstellung einer 1D-Gellösung, die für mindestens 5 Gele ausreicht, werden folgende Lösungen gemischt:

2,4 ml 40% Acrylamid
1,0 ml 2,5%N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS)
5,6 ml 0,25 M Natriumphosphat, pH 7,1
0,15 ml 20% SDS
0,7 ml 1,5% Ammoniumpersulfat

auf 19,75 ml mit Wasser aufgefüllt und anschließend an der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Danach werden 0,25 ml einer 1 proz. TEMED-Lösung zugegeben. (Die Endkonzentrationen der Lösungsbestandteile sind in Abb.7 angegeben).

Die Acrylamid- und BIS-Lösungen werden vorher mit einem Mischbettaustauscher entionisiert und in dunklen Flaschen bei 4°C nicht länger als 14 Tage aufbewahrt. Die TEMED- und Ammoniumpersulfatlösung werden jedesmal unmittelbar vor Gebrauch frisch hergestellt.

1D-Elektrophorese

Die Oberfläche des 1D-Gels wird wiederholt mit einer Lösung von 12,5 mM Natriumphosphat, pH 7,1, 0,5% SDS, 7,5% Glycerin (1D-Schutzlösung) gespült; anschließend werden 125-250 µl (d.h. das 2 1/2-fache des Probenvolumens) dieser Lösung auf das 1D-Gel aufgetragen. Der 1D-Schutzlösung wird nun die Probenlösung (Volumen 50-100 µl, Proteingehalt 75-150 µg) unterschichtet. Anschließend werden die Glasröhrchen bis zum Rand mit Elektrodenpuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,1; 0,1% SDS) aufgefüllt. Jegliches Vermischen der einzelnen Schichten ist dabei unbedingt zu vermeiden.

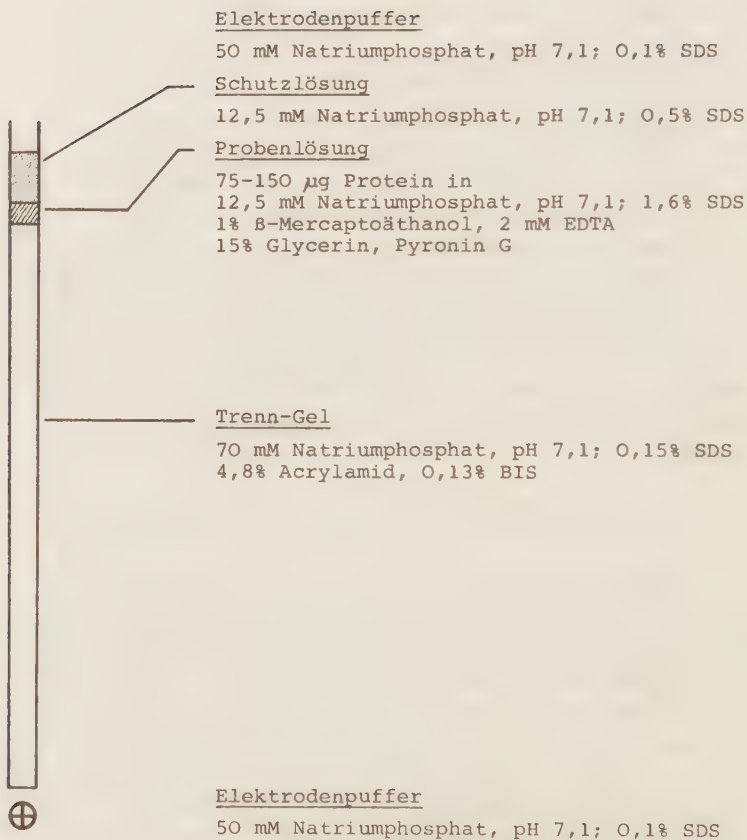


Abb.7 Schematische Darstellung der Verhältnisse in Probenlösung und 1D-Elektrophorese mit Angabe der Endkonzentrationen der verwendeten Lösungen (vgl.S.34,35).

Die Elektrophorese wird bei Zimmertemperatur über insgesamt 4 Stunden nach folgendem Plan durchgeführt (die Stromstärkewerte gelten für das einzelne Gelröhrchen): 10 Min. bei 2,5 mA, 20 Min. bei 5 mA, 210 Min. bei 7,5 mA. Dabei wird schließlich eine Spannung von ungefähr 65 Volt erreicht.

Die Basis der 1D-Elektrophorese bildet ein kontinuierliches Phosphatsystem, pH 7,1. Durch entsprechende Wahl der Leitfähigkeiten in den verschiedenen Kompartimenten des 1D-Gelsystems wird mit kontinuierlichen Systemen eine ebenso gute Auflösung wie mit den komplizierteren diskontinuierlichen Systemen erreicht (vgl. auch 91,95). Das heißt vor allem, die Leitfähigkeit in der aufgetragenen Probe muß geringer sein als im Gelpuffer. Ein Vergleich der Konzentrationen des Phosphatpuffers von Probe und 1D-Gel gibt ein entsprechendes Beispiel. Als Folge dieser unterschiedlichen Leitfähigkeiten bildet sich in der Initialphase der Elektrophorese ein hoher elektrischer Feldstärkegradient im Bereich der Probe aus, wodurch die einzelnen Komponenten der Probe zu sehr schmalen Zonen geschärft werden. Die Qualität dieses Konzentrationseffektes bestimmt im wesentlichen die in dem betreffenden System erreichbare Auflösung. Die Molarität im Elektrodenpuffer ist absichtlich höher gewählt, damit der Spannungsabfall zwischen Elektroden und Gelbeginn nicht zu groß wird. Um jedoch die Ausbildung und Wirkung der beabsichtigten initialen Feldstärkegradienten nicht durch zu frühzeitiges Eindringen von Ionen aus dem Elektrodenraum zu stören oder zu verhindern, wird eine sogenannte 1D-Schutzlösung zwischen Probe und Elektrodenpuffer geschichtet. Die Dichte der einzelnen Lösungen ist dabei so gewählt, daß durch sorgsames Unterschichten bzw. Übersichten jegliches Vermischen vermieden werden kann. Ein Volumenverhältnis von 1D-Schutzlösung zu Probenlösung von 2,5:1 erwies sich dabei als am günstigsten.

Da die Proteinkonzentration in den Membransuspensionen von Präparation zu Präparation jeweils variiert, die Auftragung gleicher Proteinmengen jedoch Voraussetzung bei vergleichenden Untersuchungen ist, erweist sich der Spielraum bezüglich des Probenvolumens als besonders vorteilhaft. Da das jeweils korrespondierende Volumen an 1D-Schutzlösung eingesetzt wird, sind auch bei unterschiedlichen Probenvolumina gleiche Verhältnisse in der 1D-Elektrophorese garantiert. (Das Probenvolumen sollte nach Möglichkeit 100-120 μ l nicht übersteigen).

Ein Vergleich mit anderen Puffersystemen wie Tris-HCl, Tris-Borat, Tris-Acetat (54) zeigte die Überlegenheit eines Phosphatpuffersystems für diese Verwendung.

Weitere Versuche ergaben, daß sowohl die absolute Acrylamid-Konzentration als vor allem auch das Acrylamid/BIS-Verhältnis ganz entscheidenden Einfluß auf die Qualität der Trennung haben. Dies gilt in besonderem Maße für die Glykoproteine. Bei der Festsetzung der Acrylamid- und BIS-Konzentrationen sind dabei zwei Punkte im Auge zu behalten: Einmal die Qualität der Trennung (das erreichte Auflösungsvermögen) im 1D-Gel und zum zweiten - und nicht weniger wichtig - das Auswandern der Fraktionen aus dem 1D-Gel bei der 2D-Elektrophorese. Dies wurde untersucht in Abhängigkeit von:

- a) absoluter Acrylamid-Konzentration
- b) Acrylamid/BIS-Verhältnis
- c) verschiedenen Puffersystemen

Dabei wurde gleichzeitig das zeitabhängige Wanderverhalten der Glykoproteine während einer 6-stündigen Elektrophorese geprüft. Hierzu wurde jeweils nach 2, 4 und 6 Stunden ein Gel aus der Elektrophorese entfernt

und auf Glykoprotein gefärbt. Die erhaltenen Glykoproteinbanden wurden durch Einspritzen von Tusche ins Gel markiert. Anschließend wurde das Gel einer Färbung auf Protein unterworfen. Das Resultat ermöglichte die Lokalisation der markierten Glykoproteinbanden. (Über Einzelheiten der Färbemethoden s.S.76). Überraschenderweise zeigten die Glykoproteine nicht in allen untersuchten 1D-Gelsystemen ein konstantes Wanderverhalten. Vor allem in dem sehr oft angewandten Tris-Acetat-System (54) lagerte sich die Hauptglykoprotein-Komponente der Erythrozytenmembran nach 2, 4 und 6 Stunden jeweils an anderer Stelle ab.

Die günstigsten Verhältnisse wurden schließlich bei einer Acrylamid-Konzentration von 4,8% und einem Acrylamid/BIS-Verhältnis von 37:1 gefunden. Alle Komponenten zeigten in diesem System ein zeitkonstantes Wanderverhalten.

1.4.2.3 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Herstellung der Gele für die 2.Dimension (2D-Gele)

Die Elektrophorese in der 2.Dimension wird mit einem von NEES und SCHMIDT entwickelten Elektrophoresegerät durchgeführt (91,116). Die verwendete analytische Kammer ist 0,5 cm dick, 15 cm breit und 20 cm hoch; in ihr wird eine Gelplatte von 11 cm Höhe gegossen. Vor der Herstellung der Gelplatte werden die Pufferräume des Gerätes mit Wasser von 4°C gefüllt, um die Gelkammer zu kühlen. Je 45 ml der Gellösungen A und B (Zusammensetzung s. unten) werden in die zwei Kompartimente eines Gradienten-Mischgerätes für lineare Gradienten gefüllt. Das Gradienten-Misch-

gerät steht in einem Eisbad und ist so angeordnet, daß die gemischte Lösung auf Grund eines hydrostatischen Gefälles innerhalb von 15 Min. ausfließen kann. Die Gellösung wird über eine lange Pipette, auf deren fein ausgezogenes, unteres Ende ein englumiger PVC-Schlauch gesteckt ist, in die Gelkammer eingefüllt. Das Ende dieses PVC-Schlauches wird dabei stets unmittelbar über dem Meniskus des ansteigenden Gradienten gehalten und muß während der gesamten Einfüllperiode beständig und langsam über die ganze Breite der Gelkammer hin und her bewegt werden. Zum Schluß wird die eingefüllte Gellösung mit ungefähr 2 ml 0,05% Ammoniumpersulfat - 0,01% TEMED überschichtet. Die Kühlflüssigkeit eines Kältebades, die vorher auf 7°C gebracht worden war, wird nun durch die Kühlschlangen des Elektrophoreseapparates gepumpt. Die Temperaturregelung des Kältebades wird ausgeschaltet: Auf diese Weise steigt die Temperatur in den Pufferräumen des Elektrophoresegerätes innerhalb von ca. eineinhalb Stunden auf 15°C an. Während dieser Zeit erfolgt eine homogene Polymerisation des Gelgradienten, sofern jede Erschütterung des Gerätes peinlichst vermieden wird. Nach der Polymerisation wird die überschichtete Lösung von der Oberfläche des Gelgradienten abgesaugt. Die Geloberfläche wird mit einer Lösung von 0,25 M Tris-HCl, pH 8,9, gespült und bis ungefähr 5 Stunden vor dem Start der 2D-Elektrophorese unter dieser Lösung belassen. Zu diesem Zeitpunkt werden - nachdem die überschichtete Lösung abgesaugt wurde - 7,5 ml einer Vor-Gel-Lösung (Zusammensetzung s. unten) auf das Gradienten-Gel gegossen und mit 0,05% Ammoniumpersulfat - 0,01% TEMED überschichtet. Nach der Polymerisation des Vor-Gels wird dieses mit einer Lösung von 0,1 M Tris-HCl, pH 8,9, gespült und anschließend unter dieser Lösung belassen. (Die Endkonzentrationen der Lösungsbestandteile des 2D-Gels sind in Abb.8 (S.42) angegeben.

Lösungen und Puffer für die 2D-Elektrophorese

Lösung A (5% Acrylamid)

11,25 ml 1M Tris-HCl
pH 8,9
5,6 ml 40% Acrylamid
3,0 ml 2,5% BIS
2,5 ml 1,5% Ammonium-
persulfat

Lösung B (15% Acrylamid)

11,25 ml 1M Tris-HCl
pH 8,9
16,9 ml 40% Acrylamid
9,0 ml 2,5% BIS
2,5 ml 1,5% Ammonium-
persulfat

Beide Lösungen werden mit Wasser auf 45 ml aufgefüllt. Nach dem Evakuieren der Lösungen an der Wasserstrahlpumpe werden je 20 µl TEMED zugegeben. Alle Schritte werden im Eisbad ausgeführt.

Vorgellösung

2,0 ml 1M Tris-HCl
pH 8,9
2,5 ml 40% Acrylamid
1,0 ml 2,5% BIS
1,2 ml 1,5% Ammonium-
persulfat
5 µl TEMED; H₂O ad 20,0 ml

Kathodenpuffer, pH 8,9

90,5 Tris
61,0 Glycin
1,0 g NaN₃
H₂O ad 5,0 l

Anodenpuffer, pH 8,9

170 g Tris
1,4 g NaN₃
ungefähr 24 ml conc. HCl
H₂O ad 7,0 l

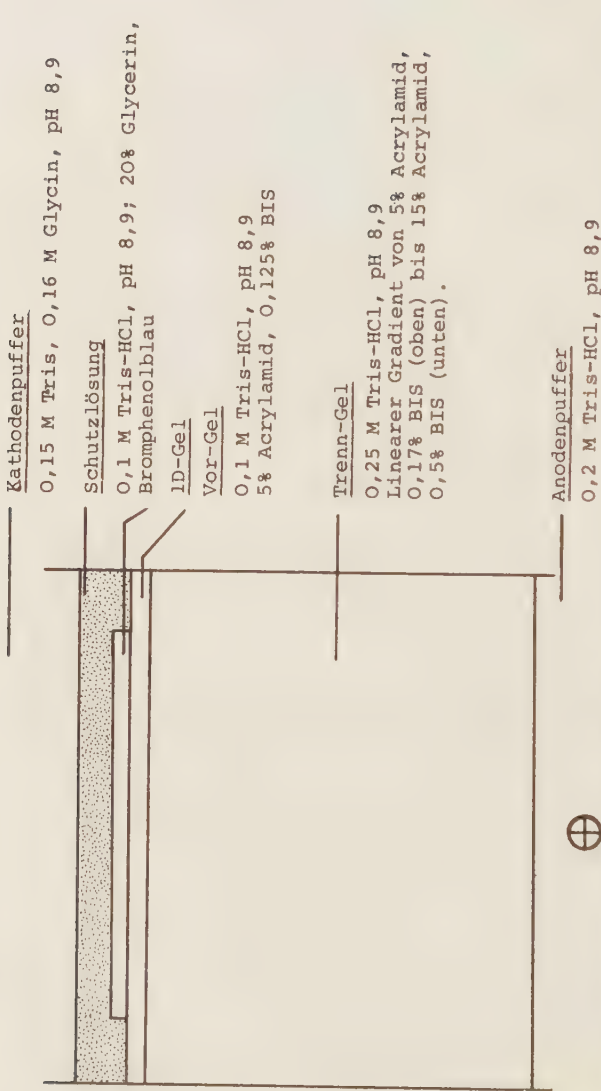


Abb. 8 Schematische Darstellung des Trennsystems der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Angabe der Endkonzentrationen der verwendeten Lösungen. (Trenn-Gel der 2. Dimension: Linearer Polyacrylamid-Gelgradient von 5-15% Acrylamid). Das Anodenende des ID-Gels zeigt nach rechts. Weitere Erläuterung s. Text (S.44).

2D-Elektrophorese

Das 1D-Gel dient als horizontales Startgel für die 2. Dimension. Nachdem das Gelstäbchen vorsichtig aus dem Glasröhrchen entfernt wurde, wird es durch eine 15-minütige Inkubation bei Zimmertemperatur in einer Lösung von 500 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,9, an die 2. Dimension angeglichen.

In der Zwischenzeit wird die überschichtete Lösung vom Vor-Gel abgesaugt. Die auf 4°C vorgekühlten Elektrodenpuffer werden in die entsprechenden Pufferräume des Elektrophoresegerätes eingefüllt, wobei der Kathodenpuffer nur soweit eingegossen wird, daß er das obere Ende der Gelkammer noch nicht erreicht. Das äquilibrierte 1D-Gel wird mit Hilfe einer Glasplatte auf das Vor-Gel gepreßt. Dabei ist darauf zu achten, daß alle Luftblasen vollständig entfernt werden. Die Gelkammer und der Kathodenpufferraum werden nun mit Kathodenpuffer bis zu dem für die Elektrophorese notwendigen Niveau aufgefüllt. Zum Schluß wird eine Lösung von 0,1 M Tris-HCl, pH 8,9, 20% Glycerin, die schwach mit Bromphenolblau angefärbt ist (2D-Schutzlösung), dem Kathodenpuffer in der Gelkammer zu einer Höhe von 9 mm unterschichtet.

Die Elektrophorese wird gestartet mit einer konstanten Stromstärke von 40 mA über 3 Stunden. Während dieser Zeit steigt die Spannung von 100 auf 180 Volt an. Für weitere 5 Stunden wird dann bei einer konstanten Spannung von 250 V getrennt, wobei die Stromstärke von 55 auf 40 mA absinkt. Die Temperatur wird in einem Bereich von 1-4°C gehalten.

Nach Beendigung des Laufes wird die Gelplatte aus der Kammer genommen und sofort in Färb- oder Fixierlösung gelegt. (Färbemethoden und Dokumentation s.S. 76).

In der Konzeption des Elektrophorese-Systems der 2.Dimension mußten vornehmlich zwei Faktoren berücksichtigt werden: In erster Linie die Notwendigkeit einer elektrophoretischen Entfernung des proteingebundenen SDS in der Initialphase der 2D-Elektrophorese, zum zweiten eine weitere Auftrennung, d.h. verbesserte Auflösung der in der 1D-Elektrophorese erhaltenen Proteinfraktionen.

Durch die hier angewandte Kombination eines Vor-Gels und einer 2D-Schutzlösung mit niedriger Leitfähigkeit liegt das 1D-Gel gleichsam eingebettet in einem Bereich hoher initialer Feldstärke zu Beginn der 2D-Elektrophorese (vgl. Abb.8). Dadurch sind sehr günstige Bedingungen für die Entfernung des proteingebundenen SDS gegeben; die niedrigen Acrylamid- und BIS-Konzentrationen erleichtern das Auswandern der Proteinkomponenten aus den Fraktionen des 1D-Gels.

Das gewählte alkalische pH des Puffersystems, das während der Trennung einen Wert um pH 9,5 erreicht, garantiert eine vollständige Dissoziation des SDS und führt in gleicher Weise zur Dissoziation der sauren Gruppen in den Membranproteinen.

Die gewählte Polung (Plus-Pol am unteren Ende) und der starke elektrische Feldstärkegradient sorgen für ein schnelles Abwandern des entfernten SDS aus den Proteinfraktionen der 1.Dimension und für ein sofortiges Einwandern der Komponenten dieser Fraktionen in das 2D-Gel. Aus diesen Gründen sind auch der Anoden- und Kathodenpuffer verschieden zusammengesetzt. Der Kathodenpuffer enthält keine Chloridionen, wodurch ein Nachwandern dieser Ionen hoher Leitfähigkeit aus dem Reservoir des Elektrodenpuffers vermieden wird.

Vergleichende Untersuchungen mit anderen Puffersystemen wie Tris-Borat und Phosphat zeigten deutlich die Überlegenheit des Tris-HCl-Systems für diese Verwendung.

Unter den gewählten Bedingungen konnte die Anpassung des 1D-Gels an das Elektrophoresesystem der 2.Dimension auf ein viertelstündiges Äquilibrieren beschränkt werden. Dies dient in erster Linie dem Austausch des Phosphatpuffers im 1D-Gel gegen den Tris-HCl-Puffer des 2D-Systems, sowie der teilweisen Entfernung von vornehmlich nicht proteingebundenem SDS im Gelpuffer des 1D-Gels.

Das Aufpressen des 1D-Gels auf das bereits zuvor hergestellte Vor-Gel erbrachte gegenüber dem Einpolymerisieren wesentliche Verbesserungen: Der damit erreichte innige Kontakt zwischen 1D-Gel und Vorgel führt zu einer starken Konzentrierung der einwandernden Proteine, so daß auch Komponenten sehr geringer Intensität im Gel der 2.Dimension abgebildet werden.

Es muß betont werden, daß die hier angegebenen Konzentrationen der Pufferlösungen auf die Verhältnisse des verwendeten Elektrophoresegerätes zugeschnitten sind. Bei Verwendung eines anderen Gerätes könnte eine Modifizierung der hier gegebenen Pufferkonzentrationen notwendig werden.

1.4.3 Standardisierung der Methode und Ergebnisse

Die Trennung der Proteine und Glykoproteine der menschlichen Erythrozytenmembran durch eindimensionale SDS-PAGE ist in Abb.9 (S.49) dargestellt.

Bei direkter Betrachtung der mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gele sind insgesamt 27 streng reproduzierbare Proteinbanden zu erkennen. Aus praktischen Gründen wurden die Banden in drei Gruppen (A,B,C) unterteilt und innerhalb jeder Gruppe nach zunehmender elektrophoretischer Beweglichkeit fortlaufend numeriert: A1 bis A12, B1 bis B3, C1 bis C12. Sie bilden die Grundlage für die Nomenklatur des 2-dimensionalen Musters.

Die Perjodat-SCHIFF-Färbung ergibt 5 Banden, die nach steigender Beweglichkeit mit P1 bis P5 (PAS-positiv) bezeichnet werden (vgl. Abb.9a, S.49). Ein Vergleich ihrer Wanderstrecken mit jenen der Proteine ergibt: P1 wandert inmitten B1, P2 ist im Bereich von B2 lokalisiert, P3 entspricht der diffusen Bande C4, P4 liegt in enger Nachbarschaft zu C9, während P5, die schnellste PAS-positive Bande, Phospholipide und Glykolipide enthält.

Abb.10 (S.50) zeigt das 2-dimensionale Muster der Membranproteine, wie es nach den auf S.43 angegebenen Bedingungen (vgl. Abb.8, S.42) erhalten wird. Da die bei direkter Betrachtung der Gele erkennbaren feinen Einzelheiten durch die Fotografie nicht befriedigend wiedergegeben werden, ist eine schematische Darstellung des Musters hinzugefügt (Abb.11, S.51). Das Ergebnis zeigt, daß viele Banden, die in der 1D-Elektrophorese homogen erscheinen, in eine Anzahl von Flecken unterschiedlicher Beweglichkeit aufgetrennt werden. Dies offenbart eine vorher nicht gekannte Komplexität der Membranproteine und zwar vornehmlich der integrierten Membranproteine (vgl. B-Region).

Die Bedingungen der Elektrophorese sind so gewählt, daß alle Proteine der Membran im 2-dimensionalen Muster erfaßt werden. Das hat zur Folge, daß nicht alle Flecke ausreichend weit voneinander getrennt sind. Um diesen Mangel auszugleichen, wird eine weitere 2-dimensionale Elektrophorese unter veränderten Bedingungen durchgeführt. Die Änderungen sind folgende:

1D-Elektrophorese: Laufzeit 6 1/2 Stunden

1D-Elektrophorese: Gelgradient 5-12% Acrylamid - O,17-O,4% BIS; Laufzeit: 3 Stunden bei konstanter Stromstärke von 40 mA und weitere 6 Stunden bei konstanter Spannung von 250 V.

Abb.12 (S.52) zeigt das Ergebnis einer Elektrophorese unter den veränderten Bedingungen. Der Verlust einiger schnell wandernder Komponenten (C2.1,C7.1,C9.4,C10, C11,C12, bezeichnet in Abb.11, S.51) muß als Preis für die verbesserte Auftrennung hingenommen werden.

Im Hinblick auf die Anwendung dieser Technik in späteren Untersuchungen wird folgende Bezeichnung der Proteinflecke festgelegt: Wird eine in der 1D-Elektrophorese offensichtlich homogene Bande (Numerierung s. S.46 und Abb.9c,S.49) in der 2D-Elektrophorese in mehrere Flecke unterschiedlicher Beweglichkeit aufgetrennt, so ist eine weitergehende Numerierung notwendig: Diese beginnt dann mit der schnellsten Komponente, wie z.B.B1.1 bis B1.12 (s.Abb.13, S.53).

Infolge der Vorherrschaft einiger Proteine in der Erythrozytenmembran ist es unmöglich, alle Flecke in einem 2-dimensionalen Muster zu zeigen. Trägt man nicht mehr als 120 µg Protein auf ein Gel auf, um eine Überladung der Hauptkomponenten zu vermeiden, so können die sehr schwachen Banden A4,A12,C1 und C6, die in der

ersten Dimension zu erkennen sind, im 2D-Gel nicht mehr entdeckt werden. Deshalb kann, je nach verfolgter Absicht, eine Serie von Läufen mit verschiedener Beladung der Gele notwendig sein.

Das Ergebnis der Perjodat-SCHIFF-Färbung zeigt Abb.14 (S.54). Die Elektrophorese erfolgte dabei unter den modifizierten Bedingungen (verlängerte Trennzeit in 1D- und 2D-Elektrophorese; 2D-Gelgradient 5-12% Acrylamid). Die Bande P1, welche die Hauptglykoprotein-Komponente der menschlichen Erythrozytenmembran darstellt, ist in mindestens vier verschiedene Flecke aufgetrennt, wovon B1.8 der intensivste ist. Andere Glykoproteine, die ebenfalls zu B1 zählen (gestrichelt in Abb.15, S.55), sind kaum sichtbar. Die Bande P2 ergab nur einen Fleck; er entspricht B2.2. P3 wird in die sehr schwachen Flecke C4.1 bis C4.3 aufgetrennt. Die Flecke A1 und A2.2 zeigen eine sehr schwache PAS-positive Reaktion.

Mit der in Abb.16 (S.56) schematisch dargestellten Versuchsanordnung hat man eine standardisierte Methode der 2-dimensionalen Elektrophorese der Membranproteine menschlicher Erythrozyten zur Hand. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren ihre Eigenschaft, die Komplexität der Membranproteine aufzuzeigen - mit der Möglichkeit der Differenzierung in Proteine und Glykoproteine. Ein Schwerpunkt in der Anwendung dieser Technik wird in der Durchführung vergleichender Untersuchungen liegen.

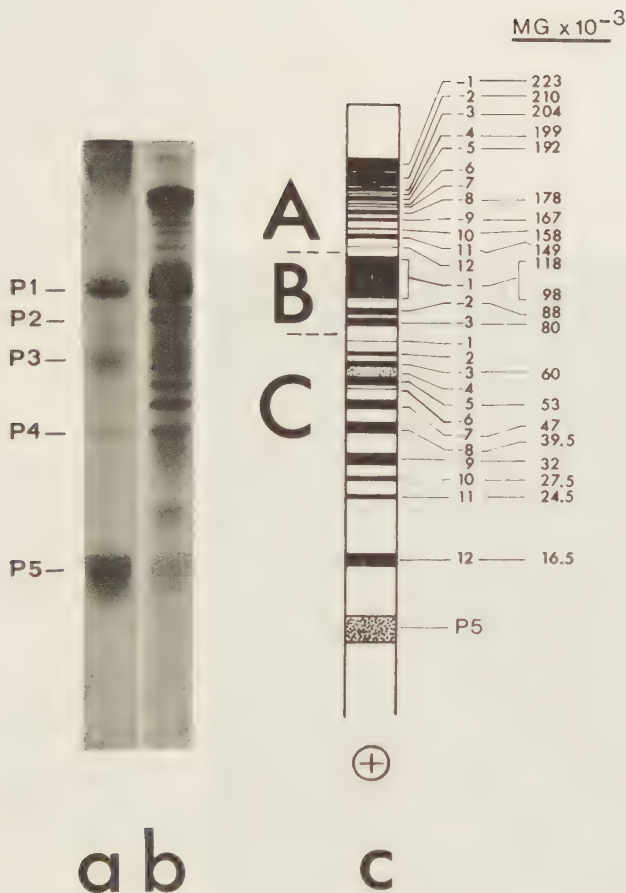


Abb.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteine und Glykoproteine der menschlichen Erythrozytenmembran. Auf die Gele wurden 40 µg Protein aufgetragen. Bedingungen der Elektrophorese s.S.37 und Abb.7 (a) Glykoproteinfärbung. (b) Proteinfärbung. (c) Schematische Darstellung der Proteinfärbung. Zur Molekulargewichtsbestimmung vgl. S.74. Erklärung der Numerierung der Banden im Text (S.46).



Abb. 10 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese der gesamten Proteine der menschlichen Erythrozytenmembran (Übersicht). Bedingungen der Elektrophorese s. S. 43 und Abb. 8. Weitere Erläuterung s. Text (S. 46).

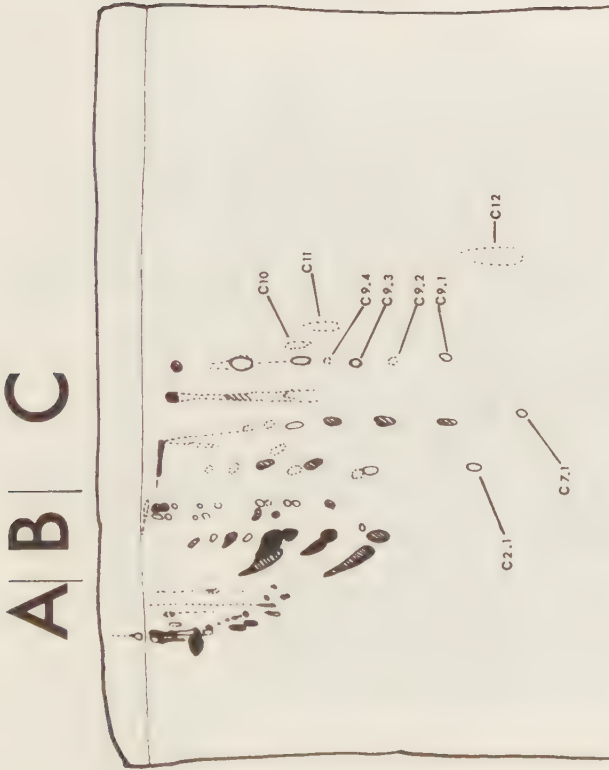


Abb.11 Schematische Darstellung des Musters der Membranproteine aus Abb.10. Komponenten, die in Abb.13 nicht abgebildet sind, werden hier numeriert. Vgl. Text (S.46). A, B und C geben die drei Gruppen der Proteinfraktionen aus dem 1D-Gel an (vgl. Abb.9).

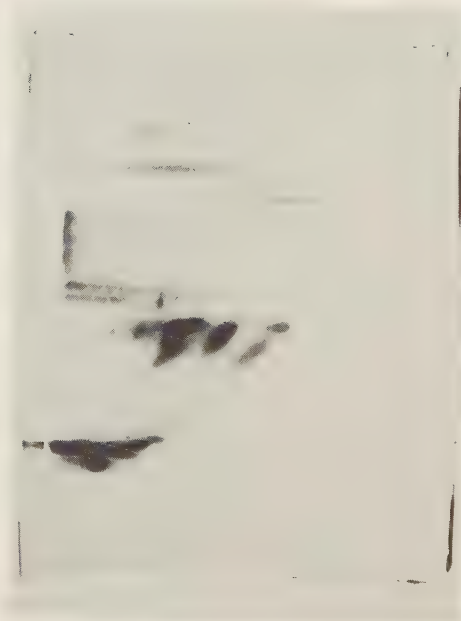


Abb. 12 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteine der menschlichen Erythrozytenmembran. Elektrophorese nach den modifizierten Bedingungen (Verlängerte Laufzeit in 1D- und 2D-Elektrophorese; Trenn-Gel der 2. Dimension: Linearer Polyacrylamid-Gelgradient von 5-12% Acrylamid. Vgl. S. 47). Weitere Erläuterung s. Text (S. 47).

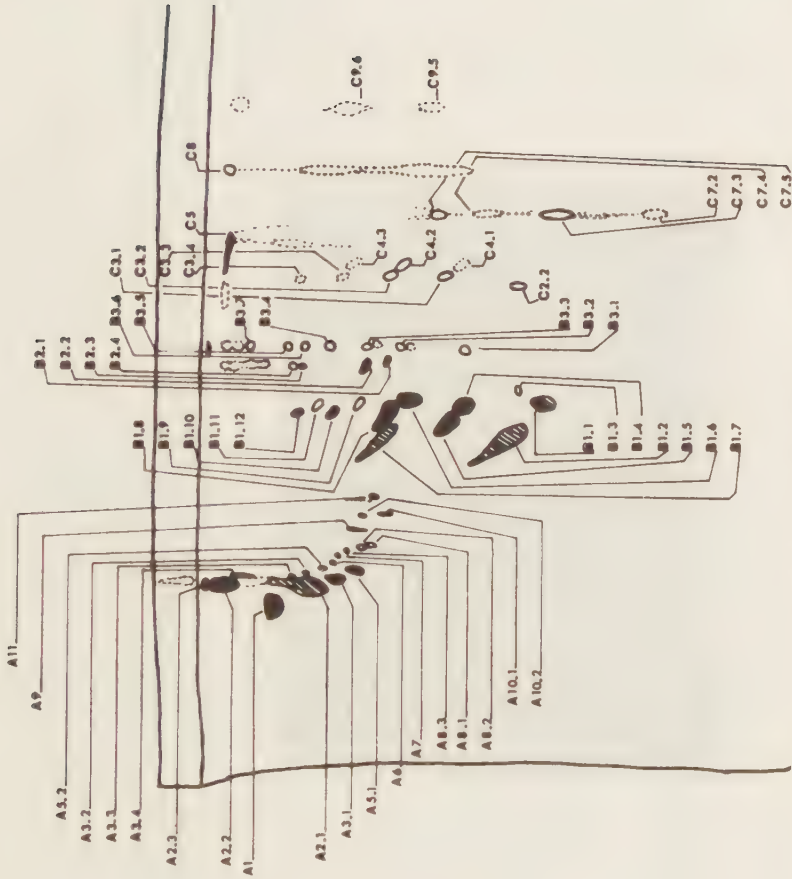


Abb.13 Schematische Darstellung des Musters der Membranproteine aus Abb.12 mit Numerierung der Komponenten im zweidimensionalen Muster. Erklärung der Numerierung s. Text (S.47)



Abb. 14 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Glykoproteine der menschlichen Erythrozytenmembran. Elektrophorese nach dem modifizierten Boettinghien (verlängerte Laufzeit in 18- und 20-Elektrophorese: Ziem-Gel der 2. Dimension: linearer polyacrylamid-Gelgradient von 5-12% Acrylamid. Vgl. S. 47). Weitere Erläuterung s. Text (S. 48).

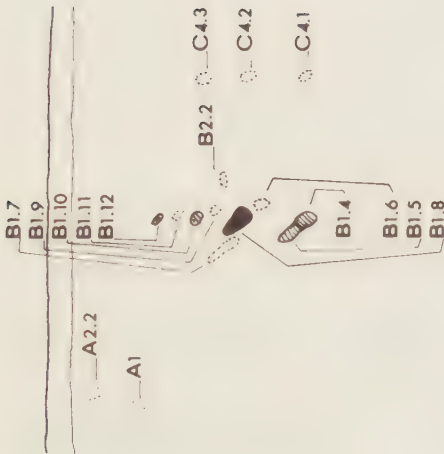


Abb.15 Schematische Darstellung des Musters der Glykoproteine aus Abb.14. Zur Erklärung der Numerierung s.S.47 und Abb.13. Weitere Erläuterung s. Text (S.48).

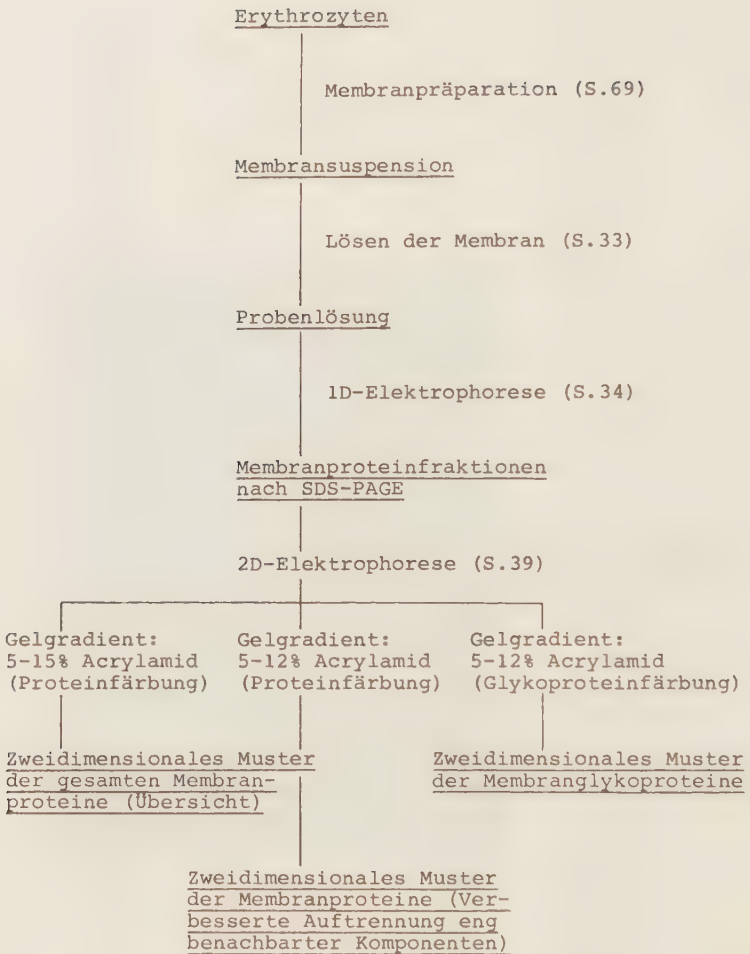


Abb.16 Versuchsanordnung zur Charakterisierung der Proteine und Glykoproteine der menschlichen Erythrozytenmembran durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

2. Anwendung des Verfahrens

2.1 Variabilität der Membranproteine

Der Einsatz der beschriebenen Methode für vergleichende Untersuchungen oder zur Ermittlung möglicher Veränderungen des Membranproteinmusters einer Zelle während ihrer Differenzierung oder Reifung hat bestimmte Voraussetzungen. Er verlangt einmal die Aufstellung eines "Normalmuster", das heißt einer Normalverteilung der Membranproteine im 2-dimensionalen Bild - zum anderen ist es notwendig, sich eine Vorstellung davon zu machen, welcher Art, wie groß Veränderungen im Spektrum der Membranproteine sein müssen, damit sie mit der vorliegenden Methode erfaßt werden können.

"Normalität" kann nur nach der Untersuchung einer Vielzahl von Individuen und mit statistischen Methoden definiert werden. Man erhält Mittelwerte mit bestimmten Variationsbreiten. Ein Individuum ist jedoch auch Träger mancher physischer Charakteristika, die außerhalb des Normbereichs liegen, aber nicht notwendigerweise pathologisch sind (2). So wurden zum Beispiel bisher 10 Varianten des Serumalbumins und über 20 genetische Varianten des Transferrins beschrieben, ohne daß bei einer dieser Formen ein Zusammenhang mit irgendeiner Krankheit bekannt geworden wäre (120). Untersuchungen zur Erfassung genetischer Polymorphismen von Plasmaproteinen und zytoplasmatischen Erythrozytenproteinen (u.a. Hämoglobin) mit elektrophoretischen Methoden zeigten, daß nur ein Drittel der Aminosäuresubstitutionen in Proteinen zu elektrophoretisch nachweisbaren Varianten führt (121).

Die biologische Variationsbreite muß daher bei der Interpretation der bei vergleichenden Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse berücksichtigt werden.

Es war daher von Interesse, mit der entwickelten Methode die Proteinmuster der Erythrozyten verschiedener Individuen miteinander zu vergleichen. Bisher wurden die zweidimensionalen Muster von vier Spendern (A, H, S, X) untersucht. Zwei Spender besaßen Blutgruppe O, je einer Blutgruppe A und Blutgruppe B. Weitere Daten können der Tabelle entnommen werden:

Blutgruppenverteilung der Spender⁺⁾

Spender A: Blutgruppe A,
Rh-Formel CcD.ee, kk, NN, P, Ss, Le^b, Fy^aFy^b.
Spender H: Blutgruppe O (Null)
Rh-Formel CcD.Ee, kk, MM, Ss, Le^bFy^aFy^b.
Spender S: Blutgruppe O (Null)
Rh-Formel CcD.ee, kk, MN, P, ss, Le^b, Fy^aFy^b.
Spender X: Blutgruppe B, Rh (D)
Rh-Formel nicht bestimmt

Bei der hier durchgeführten Versuchsreihe wurde dabei nicht von der Erwartung ausgegangen, daß die Unterschiede in der Molekülstruktur der Blutgruppenantigene ein verändertes Glykoproteinmuster bedingen werden. Ohne hier auf die Chemie der Blutgruppensubstanzen näher einzugehen (vgl. hierzu 15, 30, 34, 37, 41, 122-131), kann man sagen, daß derart diskrete Unterschiede, wie sie beispielsweise in den determinanten Gruppen der Blutgruppenantigene A und B vorliegen, kein unterschiedliches Wanderverhalten in der 2-dimensionalen Elektrophorese hervorrufen werden. Das trifft in gleicher Weise für die sogenannte Mikroheterogenität von Glykoproteinen zu, die durch den Mechanismus der Glykoproteinbiosynthese bedingt ist (vgl. 41, 52, 53, 132-135).

Ein darüber hinausgehender, genetisch bedingter Polymorphismus von Membranglykoproteinen (38, 130, 137) könnte jedoch durchaus zu einem veränderten Muster führen.

⁺⁾ Herrn Priv. Doz. Dr. K. Th. SCHRICKER, Chirurgische Universitätsklinik Erlangen, danke ich für die Bestimmung der Blutgruppenfaktoren.

Bei der sehr begrenzten Anzahl der bisher unter diesem Aspekt durchgeführten Untersuchungen kann eine Normalverteilung der Membranproteine im 2-dimensionalen Muster verständlicherweise nicht ermittelt werden. Es sollte hiermit jedoch die Frage prüfbar sein, ob sich die Membranproteinmuster von Erythrozyten verschiedener Spender überhaupt voneinander unterscheiden. Falls dies zutrifft: Sind die Unterschiede auf bestimmte Proteine der Membran beschränkt? Hinweise hierfür liefert eine neuere Arbeit von KNUFERMANN et al. (138), in der die Heterogenität der Membranproteinfraktionen nach SDS-PAGE festgestellt wurde und gezeigt werden konnte, daß einige N-terminale Aminosäuren und damit einige Membranproteine von Spender zu Spender variieren. Ein Vergleich der zweidimensionalen Muster der Membranproteine aus den Erythrozyten der Spender A,H,S und X ließ daher einige Unterschiede erwarten. (Das 2-dimensionale Membranproteinmuster des Spenders A lieferte die Grundlage für die Nomenklatur (vgl. Abb.13, S.53).

Der Vergleich zeigte eine Variabilität im Bereich der Komponenten B1.9 bis B1.12, wobei diese Komponenten stets vorhanden sind, jedoch 1-2 weitere Flecke hinzukommen können. Die Komponenten der A-Region waren invariant. Die Komponenten C2.1, C7.1 und C9.1 variierten zum Teil stark in ihren quantitativen Relationen. Die festgestellte Varianz beschränkt sich also auf wenige Komponenten der B1-Region; sie ist blutgruppenunabhängig.

Von diesen individuell bedingten Unterschieden abgesehen stellen die Ergebnisse die exakte Reproduzierbarkeit des 2-dimensionalen Musters der Membranproteine durch die entwickelte Methode heraus und

unterstreichen deren Wert als ein mögliches diagnostisches Verfahren zur Charakterisierung von Erythrozytopathien. Hierüber wird im nächsten Kapitel berichtet.

2.2 Pathologie von Membranproteinen

Bei mehreren Krankheitsbildern der Erythrozyten ist eine Veränderung von Membranproteinen festgestellt worden. Hierzu gehören hämolytische Anämien (139), paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (140,141), hereditäre Sphärozytose (142-147) und die Infektion mit Plasmodium berghei (148). Bei der zystischen Fibrose (146,149-152) ist ebenfalls von einer Veränderung der Membranproteine von Erythrozyten berichtet worden; im Falle der myotonen Muskeldystrophie (153-158) kann die festgestellte Membranveränderung noch keinem Substrat zugeordnet werden.

Die "kongenitale dyserythropoetische Anämie" ist eine erst in jüngster Zeit bekannt gewordene Anämieform (159-161). Hierzu schreiben HARTWICH et al. (159): "Sie ist bisher weder ätiologisch noch pathogenetisch eindeutig geklärt. Es lassen sich drei Untergruppen unterscheiden, die als TYP I, TYP II und TYP III bezeichnet werden. Allen Formen gemeinsam sind eine hochgradig ineffektive Erythropoese und eine daraus resultierende therapierefraktäre Anämie, charakteristische Veränderungen der roten Vorstufen im Knochenmark, eine Störung des Eisenstoffwechsels mit zunehmender allgemeiner Siderose und eine Manifestation der Erkrankung in früher Kindheit oder im Jugendalter."

Eine weitere spezifische Besonderheit dieser Anämie konnte bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Erythroblasten festgestellt werden: Diese nämlich weisen von der äußeren Kernmembran umgebene perinukleäre Zisternen auf (160).

Die Proteine der Erythrozytenmembran sind bei Patienten mit kongenitaler dyserythropoetischer Anämie bisher noch nicht auf eine mögliche Veränderung hin untersucht worden.

Die hier durchgeführte Analyse der Erythrozytenmembranproteine eines Patienten L.⁺⁾ mit einer kongenitalen dyserythropoetischen Anämie, Typ II, durch 2-dimensionale Elektrophorese ergab ein stark abnorm verändertes Muster der Membranproteine.

Der 30-jährige Patient L. (Blutgruppe O, Rh-positiv) zeigte die für diese Form der Anämie typischen Befunde. Einige im weiteren interessierende klinische Daten sind: Die hämolytische Reihe, die untersuchten Erythrozytenenzyme und die Hämoglobinelektrophorese waren normal. Die Untersuchung der Eisenkinetik zeigte eine ineffektive Erythropoese - die Lebensdauer der Erythrozyten war um 50% verkürzt - das Hämoglobin im Serum auf das Doppelte der Norm erhöht.

Bereits bei der Präparation der Erythrozytenmembranen für die nachfolgende Elektrophorese fielen einige Besonderheiten auf: Nach dem Zentrifugieren des Blutes ließ sich die Leukozytenschicht nur mühsam vom Erythrozytensediment trennen. Die sedimentierten Erythrozyten waren dicht gepackt bis verklumpt und nur schwer zu suspendieren. Das Hämolyseverhalten war jedoch normal.

Abb.17 (S.65) zeigt die durch SDS-PAGE getrennten Membranproteinfractionen. Schon hier ist ein Unterschied im Vergleich zum Membranproteinmuster der Erythrozyten gesunder Vergleichspersonen deutlich zu sehen. Die Veränderung liegt im Bereich der massigen und ungewöhnlich konfigurierten Bande B1.

^{+) Herr} Priv. Doz. Dr. G. HARTWICH, Medizinische Universitätsklinik Erlangen, danke ich für eine Blutprobe und die Überlassung klinischer Daten.

Es treten zwei neue Banden vom Molekulargewicht 128 000 und 121 000 auf. Die Bande B1 selbst, die sich normalerweise über einen Molekulargewichtsbereich von 98 000-118 000 erstreckt, liegt jetzt im Bereich von 96 000-108 000. Darüber hinaus findet sich nach PAS-Färbung eine scharfe, intensive PAS-positive Bande unmittelbar nach Gelbeginn (Ergebnis nicht dargestellt).

Die Ergebnisse der 2-dimensionalen Elektrophoresen (Abb.18-20, S.66-68) lassen jedoch noch weit größere Veränderungen im Membranproteinmuster der Erythrozyten erkennen, als dies nach der eindimensionalen SDS-PAGE zu vermuten war. Während der A-Bereich praktisch keine Veränderungen aufweist und der C-Bereich im wesentlichen erhalten blieb, ist vor allem die B1-Region völlig verändert (vgl. Abb.18a und b, S.66). Dies ist am besten in Abb.19b (S.67) zu erkennen: Die völlige Verschiedenheit der B1-Komponenten bei kongenitaler dyserythropoetischer Anämie im Vergleich zum "Normalbild" wird hier am deutlichsten demonstriert. Eine neue eigenartig konfigurierte Komponente erscheint zusätzlich zu Beginn der C-Region.

Weiteren Aufschluß erbringt die PAS-Färbung auf Glykoprotein (s.Abb.20, S. 68). Überraschenderweise zeigen die Komponenten A3.1 und A5.1 plötzlich schwach PAS-positive Reaktion. Die massiven Veränderungen im B1-Bereich gehen deutlich aus Abb.20b (S.68) hervor. Die neu hinzugekommene Komponente zwischen dem B1- und B2-Komplex ist intensiv PAS-positiv, während die sonst stark PAS-positive Komponente B2.2 nur schwach angefärbt wird. Es ist hier ein weiterer PAS-positiver Fleck zu erkennen, der bei der Färbung mit Coomassie Brilliant Blau nicht erscheint.

Damit wurde für die kongenitale dyserythropoetische Anämie im vorliegenden Fall des Patienten L. eine be-

trächtliche, abnorme Veränderung der Membranproteine nachgewiesen. Sie betrifft vor allem integrierte Membranproteine, mit besonderer Betonung der Glykoproteine.

Ein Vergleich der Ergebnisse der eindimensionalen SDS-PAGE (s.Abb.17) mit jenen der zweidimensionalen Elektrophorese (s.Abb.18, S.66) hinsichtlich einer möglichen Aussage über die vorliegenden Veränderungen der Membranproteine demonstriert nachhaltig den enormen Informationszuwachs durch die zweidimensionale Analytik.

Die starke, abnorme Veränderung integrierter Membranproteine, vor allem der Glykoproteine, die auf die Hälfte verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten und ihr abnormes Verhalten bei der Präparation der Membranen (vgl.S.62) deuten vor allem in Richtung eines (stark) veränderten Sialinsäuregehaltes der Membranglykoproteine (vgl. hierzu 41,131). Die Prüfung der Membranen auf das Vorhandensein sogenannter "carcinoembryonic antigens" ist angezeigt (vgl.162).

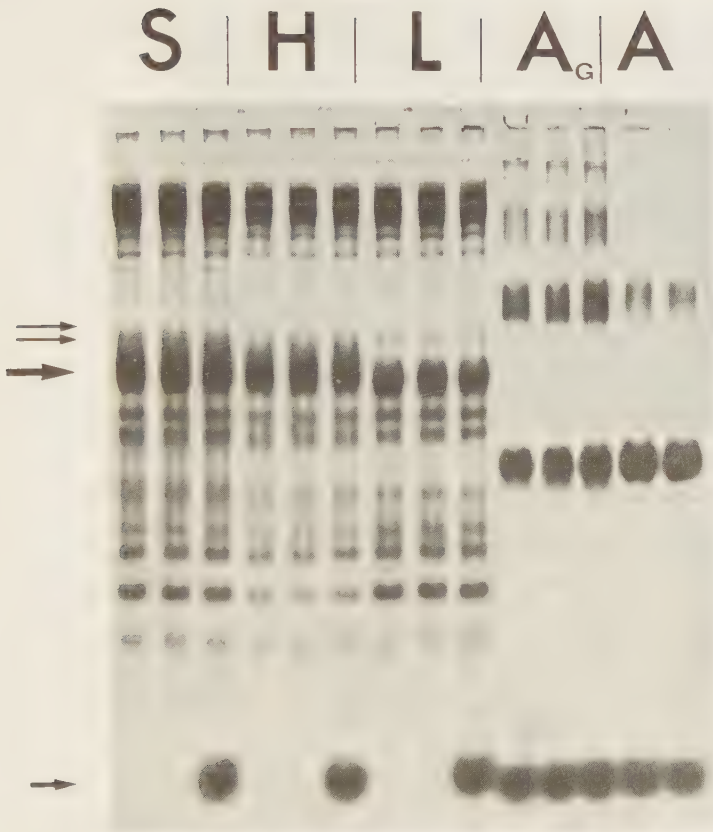
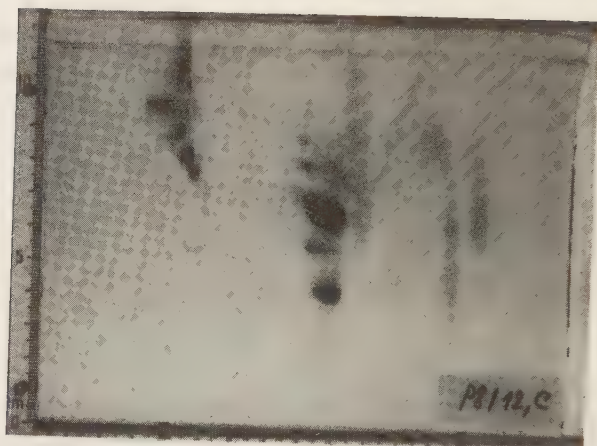
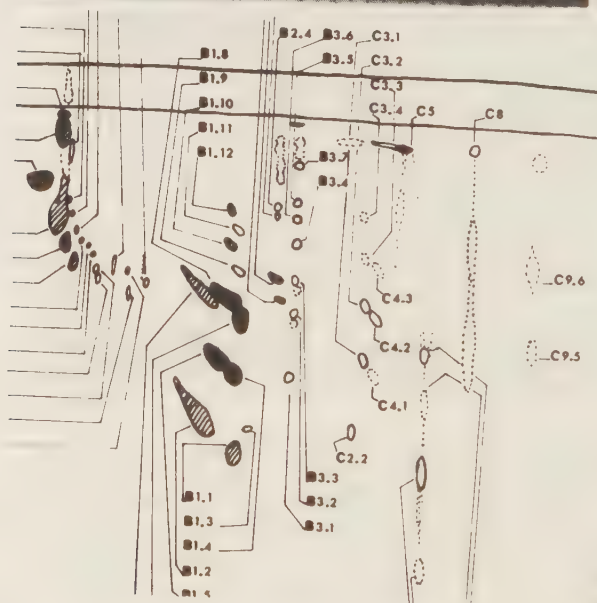


Abb.17 Vergleichende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Molekulargewichtsbestimmung. In den Positionen S, H, und L wurden die Membranproteinlösungen der Erythrozyten von zwei Gesunden (S,H) und von einem Patienten mit kongenitaler dyserythropoetischer Anämie (L) getrennt. Jede Probe wurde dreifach aufgetragen. Die B₁-Fraktion (→) des Patienten (L) ist gegenüber jenen der gesunden Vergleichspersonen (S,H) deutlich verändert. Zusätzlich treten zwei neue Banden (⇐⇐) auf. (Vgl.S.62). Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden weiterhin Albumin (A) und Glutaraldehyd-behandeltes Albumin (A_G) aufgetragen. die intensive Bande am unteren Gelende repräsentiert das Bezugsprotein Cytochrom c (→). Weitere Erläuterung s.S.74.



a



b

Abb.18 Zweidimensionales Muster der Membranproteine von Erythrozyten bei kongenitaler dyserythropoetischer Anämie (a). Bedingungen der Elektrophorese s.S.47. Erläuterung s. Text (S.63). Zum Vergleich: Ausschnitt aus der schematischen Darstellung des Musters einer gesunden Vergleichsperson (b). Vgl. Abb.12 und 13.

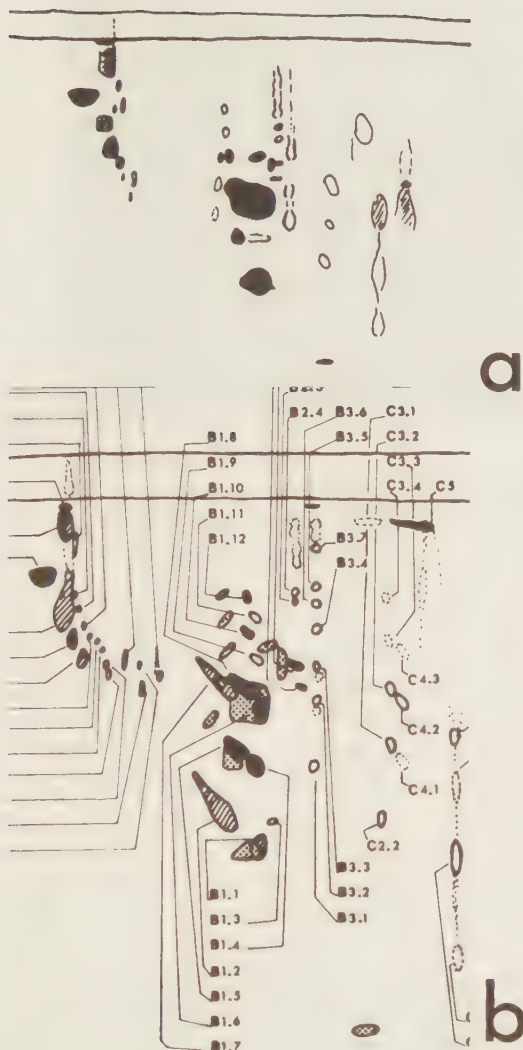
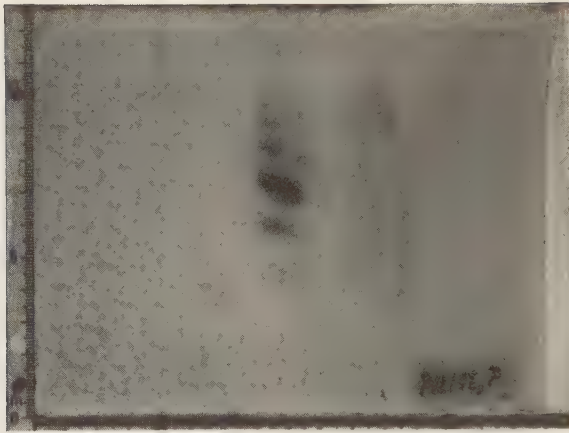
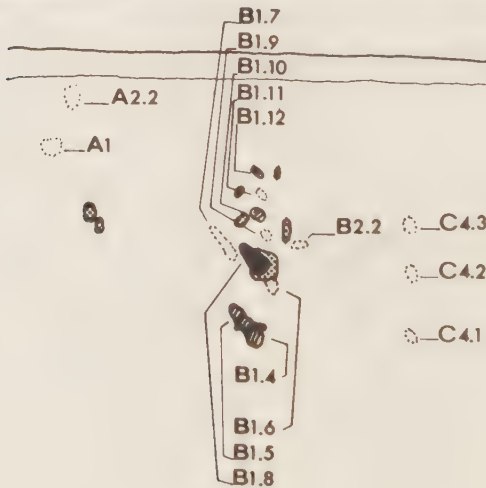


Abb.19 Schematische Darstellung des Musters der Membranproteine bei kongenitaler dyserythropoetischer Anämie (a). Die hierbei veränderten Komponenten wurden zur besseren Verdeutlichung der Abweichung punktiert in ein Schema des Normalmusters eingetragen (b). Weitere Erläuterung s. Text (S.63).



a



b

Abb.20 Zweidimensionales Muster der Glykoproteine aus der Erythrozytenmembran bei kongenitaler dyserythropoetischer Anämie (a). Die hierbei veränderten Komponenten wurden zur besseren Verdeutlichung der Abweichung punktiert in ein Schema des Normalmusters eingetragen (vgl. Abb.15) (b). Bedingungen der Elektrophorese s.S.47. Weitere Erläuterung s. Text (S.63).

3. Präparation der Membranen und Bestimmungsmethoden

3.1 Präparation der Erythrozytenmembranen.

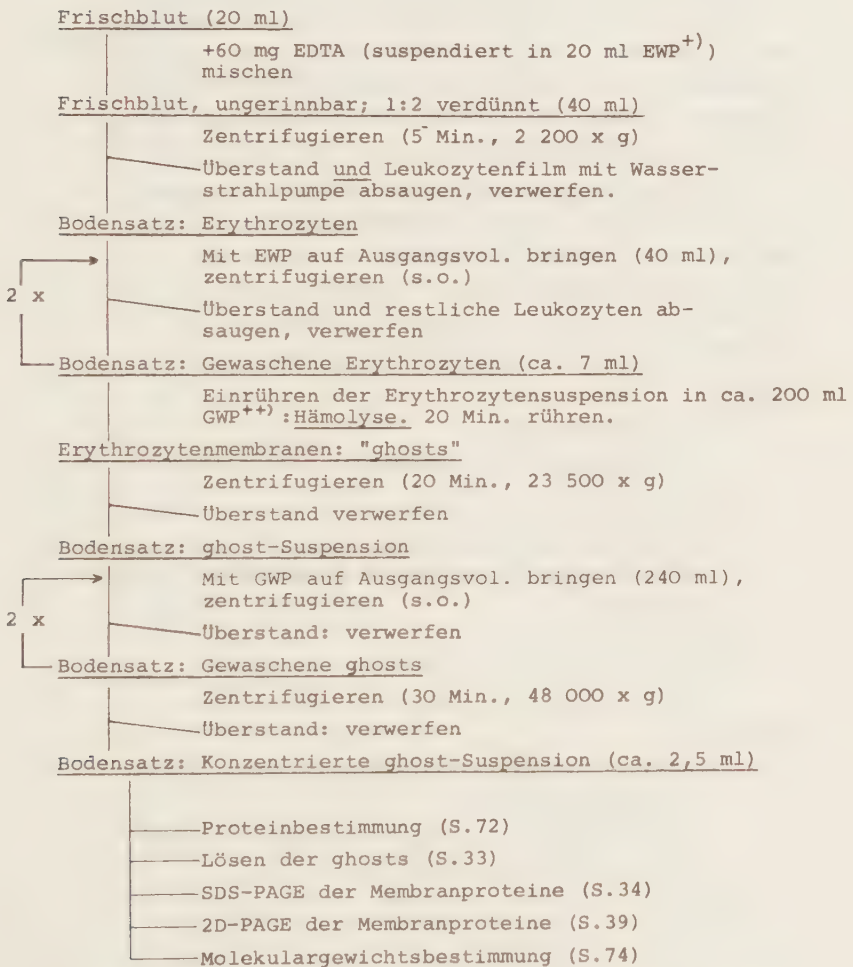
Die Plasmamembran der Erythrozyten kann auf einfache Weise durch die Methode der hypotonen Hämolyse (163) gewonnen werden. Es hat sich gezeigt, daß die Eigenschaften der als Endprodukt der Präparation erhaltenen Membranen ganz erheblich von den Verhältnissen beeinflußt werden, die im Augenblick des Aufbrechens der Membran herrschen und von der Behandlung der Membran im Anschluß daran. Diese sehr bedeutenden, da weitreichenden Zusammenhänge zwischen den Bedingungen, unter denen die Präparation durchgeführt wird, und den Eigenschaften der resultierenden Membranen oder "ghosts" sind in einer neueren Arbeit von SCHWOCH und PASSOW (164) detailliert dargestellt. Die Autoren (164) definieren den Begriff ghosts folgendermaßen: "Ghosts sind die posthämolytischen Rückstände von Erythrozyten. Es wird allgemein angenommen, daß diese Rückstände bar intrazellulärer Struktur sind und hauptsächlich aus der Zellmembran bestehen." Die Verwendung der Bezeichnung ghosts erhält ihre Berechtigung dadurch, daß sie den Zusammenhang zwischen den Präparationsbedingungen und den Eigenschaften des erhaltenen Produkts nachdrücklich herausstellt und bewußt hält. Mit anderen Worten: Immer dann, wenn man von Membranen als biochemischem Studienobjekt spricht, muß man gleichzeitig die Bedingungen, die zu ihrer Herstellung geführt haben, im Auge behalten und entsprechend berücksichtigen (Für eine ausführliche Darstellung der verschiedenen Methoden der ghosts-Präparation s. 55, 63, 164-170). Dabei sind die Arbeiten von SCHWOCH und PASSOW (164), HANAHAN (63), WALLACH und LIN (170) besonders hervorzuheben. Auf ein spezielles Problem bei der Präparation von Membranen muß noch

gesondert hingewiesen werden: Die Gefahr exogener (171) bzw. endogener (104) Proteasewirkung.

Die Präparation der ghosts erfolgte nach der Methode von DODGE, MITCHELL und HANAHAN (163) in der Modifikation von STECK et al. (172). Alle Schritte der Präparation werden bei einer Temperatur von 0-4°C ausgeführt. 20 ml frisch gezogenes Blut werden mit einer Suspension von 60 mg EDTA in 20 ml 150 mM NaCl, 5 mM Natriumphosphat, pH 8,0, gemischt und in acht 5 ml Zentrifugengläsern für 5 Min. bei 1 500 x g in einem Schwingbecherrotor zentrifugiert. Überstand und Leukozytenfilm werden sorgfältig mit der Wasserstrahlpumpe entfernt. Die sedimentierten Zellen werden in 150 mM NaCl, 5 mM Natriumphosphat, pH 8,0, zu einem Endvolumen von 40 ml suspendiert und durch Zentrifugation unter den oben angegebenen Bedingungen dreimal gewaschen. Infolge des gründlichen Absaugens der oberflächlichen Schicht des Sediments nach jeder Zentrifugation wird ungefähr ein Viertel an ursprünglichem Erythrozytenvolumen geopfert. Am Ende bleiben ca. 7 ml dicht gepackte Erythrozytensuspension.

Zur Hämolyse werden die Erythrozyten in 220 ml 5 mM Natriumphosphat, pH 8,0, eingerührt. Die erhaltene Suspension wird 20 Min. gerührt und anschließend für 20 Min. bei 25 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und der Bodensatz aus lose gepackten ghosts wird dekantiert. Das an der Gefäßwand haftende opake Material wird entfernt und verworfen. Nach zwei weiteren Waschschritten unter gleichen Bedingungen werden die ghosts durch eine halbstündige Zentrifugation bei 50 000 x g zu einer Proteinkonzentration von 2-4 mg/ml konzentriert. Die Ausbeute an konzentrierter ghost-Suspension beträgt ca. 2,5 ml.

Der besseren Übersichtlichkeit halber wird die Präparationsvorschrift in schematischer Form wiedergegeben.



+) Erythrozytenwaschpuffer (EWP): 150 mM NaCl, 5 mM Na-Phosphat pH 8,0

++) ghost-Waschpuffer (GWP): 5 mM Na-Phosphat, pH 8,0

3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von FUTTERMAN und ROLLINS (173). Die Methode fußt auf der Biuret-Reaktion und ermöglicht die Proteinbestimmung in Gegenwart von Detergentien. (Die sehr häufig angewandte LOWRY-Methode (174) ist zur Bestimmung des Proteingehaltes in SDS-haltigen Membranlösungen nicht geeignet (vgl. 75, 175)).

Die von FUTTERMAN und ROLLINS (173) angegebenen Bedingungen wurden entsprechend den Verhältnissen in SDS-haltigen Lösungen von Erythrozytenmembranen in einigen Punkten modifiziert. Die dabei erreichten Bedingungen sind in der nachfolgenden Übersicht über die Durchführung der Proteinbestimmung zusammengefaßt.

Lösungen:

a) Proteinstandard

3 mg Albumin (Serumalbumin v. Rind)/ml
SDS-Lösung (s.u.)

b) Probe

0,63 ml konz. ghost-Susp. werden mit 0,07 ml
15% SDS in 0,2 M Na-Phosphat, pH 7,1, gemischt.

c) Reagens

9 ml 30% KOH + 1 ml 2,1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

d) SDS-Lösung

1,5% SDS in 0,02 M Na-Phosphat, pH 7,1

Verfahren:

- 1) Pipettieren der Ansätze A-D in 30 ml COREX-Zentrifugengläser, mischen, verschließen.
(Alle Volumina in ml)

Ansatz	Standard/ Probe	SDS Lösung	Reagens	30% KOH
A (1,.)	0,3	/	1,0	/
B	/	0,3	1,0	/
C (1,.)	0,3	/	/	1,0
D	/	0,3	/	1,0

- 2) 10 Min. stehen lassen, dabei ständig mischen.
- 3) Zugabe von 1,7 ml 1,2-Propandiol in jeden Ansatz, mischen.
- 4) Zentrifugieren (10 Min., 20 000 x g)
- 5) Messen: bei 330 nm gegen H₂O

Auswertung:

- a) Berechnung von A₃₃₀ z.B. des Ansatzes A1

$$A_{330}(A1) = (A_{330}(A) - A_{330}(B)) - (A_{330}(C) - A_{330}(D))$$

- b) Berechnung der Konzentration der Probe

$$c_{\text{Probe}} = \frac{A_{330}(\text{Probe})}{A_{330}(\text{Standard})} \times c_{\text{Standard}} \times 1,1$$

3.3 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung der Membranproteine durch SDS-PAGE erfolgte im wesentlichen in Anlehnung an die Methoden von WEBER und OSBORN (117) und DUNKER und RÜCKERT (176). (Weiterführende Darstellungen der Methode s.4,177-181). Wie aus der ausführlichen Abhandlung der SDS-PAGE bekannt (vgl. S.21), ist die elektrophoretische Beweglichkeit SDS-gelöster Proteine eine Funktion der Molekülgröße. Diese Tatsache wird in einem Verfahren zur Ermittlung der Molekulargewichte von Proteinen unbekannter Größe genutzt. In einer SDS-PAGE werden SDS-gelöste Proteine bekannten Molekulargewichts (Eichproteine) und SDS-gelöste Proteine unbekannten Molekulargewichts getrennt. Allen Trenngemischen setzt man eine Substanz hoher elektrophoretischer Beweglichkeit (Farbstoff, niedermolekulares Chromoprotein) als Bezugssubstanz zu und setzt ihre Beweglichkeit (Wanderstrecke in mm) gleich 1. Die Beweglichkeit der Eichproteine und der Proteine unbekannten Molekulargewichts wird ermittelt und ihre relative Beweglichkeit zur Bezugssubstanz bestimmt. Trägt man für die Eichproteine in halblogarithmischer Darstellung den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts (Ordinate) gegen die relative Beweglichkeit (Abszisse) auf, so erhält man eine Eichgerade. Man bestimmt die relativen Beweglichkeiten der Proteine unbekannten Molekulargewichts und erhält ihre Molekulargewichte über die Eichgerade.

Abb. 17 (S.65) zeigt das Ergebnis einer SDS-PAGE zur Molekulargewichtsbestimmung. Die Elektrophorese wurde dabei nicht mit mehreren Gelstäbchen, sondern mit einer Gelplatte durchgeführt. Mit Hilfe eines Rezens aus Plexiglas wurde am oberen Ende der Gelplatte

eine gewünschte Anzahl von Taschen geformt; diese dienten zur Aufnahme der einzelnen Proben. Auf diese Weise wurden für die einzelnen Startpositionen vergleichbare Verhältnisse in der elektrophoretischen Trennung garantiert. Als Bezugssubstanz wurde Cytochrom c verwendet, als Eichprotein Rinderserumalbumin (MG 67 000). Die Beschaffung geeigneter Eichproteine mit hohem Molekulargewicht ist nicht einfach. Diese Schwierigkeit wurde durch eine Behandlung des Serumalbumins mit Glutaraldehyd (182) umgangen. Die Behandlung des Albumins mit Glutaraldehyd führt zur Ausbildung polymerer Albuminverbindungen, wie Albumindimer, - trimer und -tetramer. Durch diese einfache Manipulation wurden nun auch Bezugsproteine mit definiertem hohen Molekulargewicht erhalten. Das Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung der Membranproteine von Erythrozyten ist in Abb.9c (S.49) wiedergegeben. Die gefundenen Werte stimmen im Rahmen der mit dieser Methode erreichbaren Genauigkeit gut mit den aus der Literatur bekannten Bestimmungen überein (vgl.4,23,34,54,64). Die Methode erfährt ihre Einschränkung durch Proteine, die ein anomales Verhalten in der SDS-PAGE zeigen. Dies trifft für die Glykoproteine der Membran zu (vgl.183), deren Molekulargewichte infolgedessen nicht bestimmt wurden.

3.4 Färbemethoden und Dokumentation

Färbemethoden

Die Färbung der Gele auf Protein mit Coomassie Brilliant Blau erfolgt im wesentlichen nach der von WEBER und OSBORN (117) angegebenen Methode. Färbe- und Entfärbelösung setzen sich wie folgt zusammen:

<u>Färbelösung</u>	<u>Entfärbelösung</u>
2,75 g Coomassie Br.Bl.	375 ml Eisessig
500 ml Methanol	250 ml Methanol
100 ml Eisessig	H ₂ O ad 5,0 l
500 ml Wasser	

Zur Färbung werden die Gele über Nacht oder mindestens 10 Stunden lang in ein entsprechendes Volumen an Färbelösung gelegt (Gelstäbchen können in großen Reagenzgläsern in ca. 20 ml gefärbt werden. Gelplatten werden auf ein Gitter gelegt und in Plastikgefäßen in ca. 1,5 l gefärbt). Zur Entfärbung werden die Gele in ausreichend große Volumina an Entfärbelösung gelegt. (Stäbchengele am besten in 200 ml Erlenmeyerkolben und Plattengele in die bereits zur Färbung verwendeten Plastikgefäße. Eine Beschleunigung des Entfärbevorgangs wird erreicht, wenn die Entfärbung bei 60°C durchgeführt wird). Der Entfärbevorgang wird unter häufigem Wechsel der Entfärbelösung solange fortgesetzt, bis diese farblos bleibt.

Die Färbung der Gele auf Glykoprotein erfolgte nach einer Modifikation der von ZACHARIUS et al. (118) angegebenen Perjodat-SCHIFF-Methode (PAS). Die Gelplatten werden dabei nach folgendem Plan behandelt:

- (1) Methanol-Wasser-Eisessig (5/5/1;v/v); mindestens für 10 Stunden (Fixierung)
- (2) 7% Essigsäure; für mindestens 3 Stunden mit zweimaligem Wechsel
- (3) 1% Perjodsäure in 3% Essigsäure; für 75 Min.
- (4) Wasser; häufiges Wechseln, bis eine Nachweisreaktion auf JO_3^- negativ ausfällt.
- (5) SCHIFF-Reagenz, hergestellt nach FAIRBANKS et al. (54); über Nacht oder mindestens 8 Stunden
- (6) 0,5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, frisch hergestellt in 0,1 N HCl; für 1 Stunde mit zweimaligem Wechsel
- (7) Wasser (60°C); häufiges Wechseln, bis die überschüssige Farbe entfernt ist.
- (8) Aufbewahren in 7% Essigsäure

Schritt (2) ist wesentlich, um Tris aus den 2D-Gelplatten zu entfernen, das sonst mit dem Färbeprozess interferiert (119). Dieser Schritt wird zur Färbung von Gelstäbchen auf Glykoprotein weggelassen, da diese Phosphatpuffer enthalten.

Im Anschluß an Schritt (7) ist eine sukzessive Färbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blau möglich, jedoch muß dabei ein Verlust einiger Details in Kauf genommen werden.

Dokumentation

Die gefärbten Gele werden im durchscheinenden Licht fotografiert (LEITZ: Leica, Reprovit II a, Leuchtkasten, Typ 42-677.103). Zur besseren Wiedergabe aller Details werden Farbaufnahmen bevorzugt. Folgende Bedingungen haben sich als günstig erwiesen:

Gelstäbchen (schwarz-weiß): PERUTZ, Positivfilm;
1"; 1,5"; 2,25" Blende 11, Format 20 x 30 cm;
Entwickler "Rodinal" 1+50; 8 Min.

Gelplatten (schwarz-weiß): AGFAORTHO, professional 25;
1/8 und 1/4"; Blende 11; Format 20 x 30 cm;
Entwickler "Neutol" 130 ml/l H₂O; 3 Min.

Gelstäbchen und Gelplatten (farbig): AGFACHROME,
professional (18⁰); 1/15"; Blende 11 und Blende
11-16; Format 20 x 30 cm

Diskussion

Bereits 1909 erkannte Paul Ehrlich (184) die Komplexität von Struktur und Funktion der Zytoplasmamembranen. Der biochemische Nachweis der Komplexität des Proteinmusters der Membranen hatte die Entwicklung neuer Methoden zur Voraussetzung. Man konnte erst vor wenigen Jahren eine Vorstellung von der Vielzahl der verschiedenen Proteine gewinnen, die in zytoplasmatischen Membranen vorkommen. Diese Vorstellungen gehen vor allem auf Ergebnisse zurück, die man bei der Auftrennung von Membranproteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erhielt.

Der SDS-PAGE liegt ein Trennungsprinzip zugrunde, das dazu zwingt, die Frage einer möglichen Heterogenität der getrennten Proteinfractionen zu untersuchen (23,110,138). Hinsichtlich der Heterogenität der mit dieser Methode erhaltenen Proteinfractionen der Erythrozytenmembran findet man zum Teil widersprüchliche Angaben (vgl.138.185.186). Dies gilt vor allem für das Spectrin (43,47) und das Glycophorin (38). Die Schwierigkeit, die vermutete Heterogenität einer Membranproteinfraction zu beweisen, wird am Beispiel der imponierenden Fraktion B1 - ihrem Verhalten nach eine Fraktion der integrierten Membranproteine - besonders deutlich (s.15,24,54,64-66, 187-190). Obwohl die Heterogenität der B1-Fraktion seit langem vermutet wurde, ist eine Auftrennung dieser Fraktion in ihre konstituierenden Komponenten bislang nicht beschrieben worden.

Mit der hier entwickelten zweidimensionalen Elektrophorese dagegen gelingt es, die B1-Fraktion in ihre Komponenten aufzutrennen und die beeindruckende Heterogenität dieser Fraktion nachzuweisen. Das gilt in ähnlicher Weise für die Fraktionen B2 und B3.

Obwohl sich viele Arbeiten mit Spectrin befassen, ist immer noch nicht geklärt, ob jede der beiden Spectrinbanden (A1, A2) aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebaut wird oder ob sie Aggregate aus möglicherweise verschiedenen Untereinheiten darstellt. Die 2D-Elektrophorese zeigt einen auffallenden Unterschied im Verhalten der beiden Spectrinbanden. Während die Bande A2 in mehrere Flecke aufgetrennt wird, wandert A1 einheitlich.

Die Heterogenität anderer Fraktionen, wie A3, A5, A8, A10 aus der A-Region und C2, C3, C4, C7, C9 aus der C-Region, werden hier nicht im Detail besprochen, da diese Fraktionen noch nicht näher untersucht und beschrieben wurden.

Es ist dabei gerade in diesem Zusammenhang ersichtlich, wie wertvoll der mit der 2-dimensionalen Elektrophorese gewonnene Informationszuwachs für die Charakterisierung bisher noch nicht untersuchter Membranproteine ist. Ein Beispiel mag das demonstrieren: Allen Untersuchern des Spectrins ist es entgangen, daß sich in enger Nachbarschaft zur Bande A2 zwei weitere Banden (A3.3, A3.4) befinden: Nur die 2D-Elektrophorese läßt das erkennen. Damit wird deutlich, daß bei einer Proteinfraction, die in der eindimensionalen SDS-Elektrophorese eine einheitliche Bande ergibt, nicht ohne weiteres auf das Vorhandensein einer einzigen Proteinspezies geschlossen werden darf. Die Betrachtung eines 2-dimensionalen Bildes zeigt somit, daß der Informationszuwachs von Komponenten geliefert wird, die in den Fraktionen der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entweder überlagert waren oder sich in enger Nachbarschaft zu ihnen befanden.

Weiterhin kann man erkennen, daß manche der in der 2. Dimension erhaltenen Komponenten in einer Vertikalen angeordnet sind (vgl. B3). In einem solchen Fall muß auch an ein mögliches Monomer-Dimer-Gleichgewicht einzelner Komponenten gedacht werden. Das Ergebnis der 2-dimensionalen Elektrophorese eines Proteingemisches aus Serumalbumin (saures Protein), Ovalbumin (Glykoprotein) und Cytochrom c (basisches Protein) läßt an diese Möglichkeit denken (vgl. Abb. 21). Man erkennt, daß Ovalbumin in stärkerem Maße zur Ausbildung eines Dimers neigt als Serumalbumin. Es könnte nun gerade für manche Membranproteine charakteristisch sein, Aggregate (Quartärstrukturen) aus einer definierten Zahl von Untereinheiten aufzubauen (vgl. 6, 191, 192).

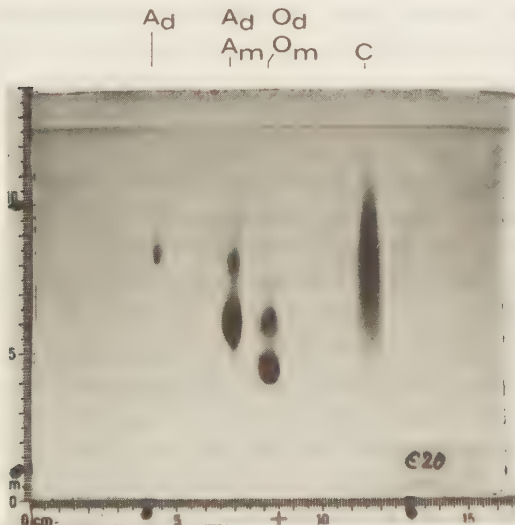


Abb. 21 Zeidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese eines Proteingemisches aus Rinderserumalbumin (A) Ovalbumin (O) und Cytochrom c (C). (m = Monomer, d = Dimer). Erläuterung s. Text.

Wie die Abb.21 weiter zeigt, verhielt sich Cytochrom c in der Elektrophorese der 2.Dimension ungewöhnlich, da es keinen diskreten Fleck lieferte. Dieses anomale Verhalten kann möglicherweise auf eine Behinderung der elektrophoretischen Entfernung des proteingebundenen SDS zurückzuführen sein, die durch den basischen Charakter des Proteins bedingt sein könnte. Eine basische Proteinkomponente der Erythrozytenmembran, die Untereinheit der Glycerinaldehyd-3P-Dehydrogenase, benimmt sich ähnlich.

Die am Beispiel der Erythrozytenmembran erarbeitete Methode eröffnet Möglichkeiten zu Untersuchungen auf den verschiedensten Gebieten der Membranbiologie. Betrachtet man die Membran als biochemisches Studienobjekt, so stehen vor allem die Beziehung zwischen Struktur und Funktion sowie Untersuchungen zur Topographie (14,131,197-203,205,206) der Membran, das heißt der Anordnung der Membranproteine innerhalb der dynamischen Funktionseinheit, im Vordergrund des Interesses. Der Glukosetransport (193-196) und die Phosphorylierung von Membranproteinen (49-51) seien als Beispiele hierfür genannt. Es ist zu erwarten, daß auf diesen Sektoren mit Hilfe der 2-dimensionalen Elektrophorese weitere Einsichten möglich werden.

Betrachtet man die Membran als physiologische Entität, so rücken Untersuchungen über mögliche Veränderungen während der Zelldifferenzierung, der Zellreifung (vgl.200,207,208) und der Zellerkrankung, besonders bei der Transformation zu Tumorzellen, in den Mittelpunkt.

In dieser Arbeit konnten mit Hilfe der 2-dimensionalen Elektrophorese bei einem Patienten mit kongenitaler dyserythropoetischer Anämie stark anomale

Veränderungen im Proteinmuster der Erythrozytenmembran erstmals gezeigt werden. Die differentielle Färbung ergab, daß hiervon vor allem die Membranglykoproteine betroffen waren. Diese Befunde ermöglichen es, in Zusammenhang mit bekannten klinischen Daten des Patienten, wie zum Beispiel Verringerung der Lebensdauer der Erythrozyten auf 50%, eine erste Vorstellung von der Art des hier vorliegenden Membrandefekts zu entwickeln.

Bei anderen Krankheitsbildern wie der hämolytischen Anämie (139, zur Differentialdiagnose s.209), der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (140,141), der hereditären Sphärozytose (142-147), der Sichelzellanämie (210), der zystischen Fibrose (146,149-152) und der myotonen Muskeldystrophie (153-158), darf von der 2D-Elektrophorese ebenfalls Aufschluß über mögliche Veränderungen im Muster der Membranproteine erwartet werden. Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang dem Studium der Membranveränderungen bei transformierten Zellen zu (110,211-213 ; zur virusinduzierten Transformation s.136,204,214).

Die hier beschriebene Methode der 2-dimensionalen Elektrophorese von Membranproteinen ist an der menschlichen Erythrozytenmembran erarbeitet worden. Es wurde aber in allen Phasen der Entwicklung ein Konzept eingehalten, das eine Anwendung auf die Zytoplasmamembranen anderer Zellen des Menschen ermöglichen sollte.

D. Zusammenfassung

Die Plasmamembran menschlicher Erythrozyten war das Untersuchungsobjekt für die Entwicklung eines Trennverfahrens für Membranproteine mit hoher analytischer Auflösung. Dabei wurde von der Voraussetzung ausgegangen, daß alle Proteine gelöst werden müssen und ohne Ausnahme an der nachfolgenden Trennung teilnehmen.

Vorversuche zur Extraktion und zur Lösung von Membranproteinen, bei denen verschiedene wäßrige und organische Lösungsmittelsysteme verwendet wurden, zeigten, daß die Membranproteine damit nur teilweise in Lösung gebracht werden konnten. Eine vollständige Lösung aller Membranproteine wurde erst mit dem ionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) erreicht.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erwies sich als ein geeignetes Verfahren zur Trennung des komplexen Proteingemisches der Plasmamembran.

Eine Methode der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde entwickelt, die eine Trennung der Proteine nach Maßgabe von Molekülgröße, Molekülgestalt und Ladungszustand ermöglicht. Dazu wurden die Membranen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat gelöst, und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der ersten Dimension in Fraktionen unterschiedlicher Molekülgröße getrennt. In der zweiten Dimension erfolgte nach elektrophoretischer Entfernung des proteingebundenen SDS eine Auftrennung dieser Fraktionen in ihre konstituierenden Komponenten.

Die Bedingungen der zweidimensionalen Elektrophorese wurden optimiert. Eine Vorschrift für eine standardisierte Methode zur Charakterisierung von Membranproteinen durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ausgearbeitet.

Bei der Anfärbung auf Proteine mit Coomassie Brillant Blau wurden ca. 65 Komponenten im zweidimensionalen Muster erhalten; 14 davon ergaben bei der Färbung auf Glykoproteine mit dem Perjodat-SCHIFF-Reagenz eine positive Reaktion.

In einer ersten Anwendung der Methode wurden die Membranproteinmuster von vier Spendern der Blutgruppen A, B, und O untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Invarianz des zweidimensionalen Musters und stellten gleichzeitig dessen exakte Reproduzierbarkeit heraus.

Die Untersuchung der Membranproteine eines Patienten mit kongenitaler dyserythropoetischer Anämie unterstrich den Wert der Methode als ein mögliches diagnostisches Verfahren bei Erythrozytopathien.

Der am Erythrozyten entwickelten zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranproteinen liegt ein Konzept zugrunde, das eine Anwendung auf die Zytoplasmamembranen anderer Zellen des Menschen ermöglichen sollte.

Literatur

- 1) Zahler P. (1971) Schweiz. med. Wschr. 101, 1490-1492
- 2) Reisfeld R.A. und Kahan B.D. (1972) Sci. Amer. 226, 28-37
- 3) Dreyer W.J., Papermaster D.S. und Kühn H. (1972) Ann. N. Y. Acad. Sci. 195, 61-74
- 4) Tanford C. (1973) "The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes", John Wiley and Sons, New York
- 5) Nicolson G.L. (1972) in "Membrane Research" (Fox C.F. Herausgeber) S. 53-70 Academic Press New York, London
- 6) Singer S.J. (1972) Ann. N. Y. Acad. Sci. 195, 16-23
- 7) Stoerkenius W. und Engelman D.M. (1969) J. Cell. Biol. 42, 613-646
- 8) Capaldi R.A. und Vanderkooi G. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. US 69, 930-932
- 9) O'Brien J.S. (1967) J. Theoret. Biol. 15, 307-324
- 10) Zahler P. (1969) Experientia 25, 449-456
- 11) Rouser G., Nelson G.J., Fleischer S. und Simon G. (1968) in "Biological Membranes" (Chapman D. Herausgeber), Band 1, S. 5-69 Academic Press, London, New York
- 12) Ferber E. (1973) in "Biological Membranes" (Chapman D. und Wallach D.F.H. Herausgeber), Band 2, S. 221-252, Academic Press London, New York
- 13) Vanderkooi G. (1972) Ann. N. Y. Acad. Sci. 195, 6-15
- 14) Meyer H.W. und Winkelmann H. (1972) Protoplasma 75, 255-284
- 15) Juliano R.L. (1973) Biochem. Biophys. Acta 300, 341-378
- 16) Marchesi V.T. und Steers Jr. E. (1968) Science 159, 203-204
- 17) Mazia D. und Ruby A. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. US 61, 1005-1012
- 18) Tillack T.W., Marchesi S.L., Marchesi V.T. und Steers E. Jr. (1970) Biochim. Biophys. Acta 200, 125-131

- 19) Marchesi S.L., Steers E., Marchesi V.T. und Tillack T.W. (1970) *Biochemistry* 9, 50-57
- 20) Hoogeveen J.Th., Juliano R., Coleman J. und Tillack T.W. (1970) *J. Mem. Biol.* 3, 156-172
- 21) Clarke M. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 1063-1070
- 22) Williams R.O. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 671-678
- 23) Gwynne J.T. und Tanford C. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3269-3273
- 24) Trayer H.R., Nozaki N., Reynolds A. und Tanford C. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 4485-4488
- 25) Tanner M.J.A. und Gray W.R. (1971) *Biochem. J.* 125, 1109-1117
- 26) Shin B.C. und Carraway K.L. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1436-1444
- 27) Schrier St. L. (1966) *Amer. J. Physiol.* 210, 139-145
- 28) Kant J.A. und Steck T.L. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 8457-8464
- 29) Maretzki D., Groth J., Tsamaloukas A.G., Gründel M., Krüger S. und Rapoport S. (1974) *Febs Lett.* 39, 83-87
- 30) Whitemore N.B., Trabold N.C., Reed C.F. und Weed R.I. (1969) *Vox Sang.* 17, 289-299
- 31) Bretscher M.S. (1971) *Nature New. Biol.* 231, 229-232
- 32) Marchesi V.T. und Andrews E.P. (1971) *Science* 174, 1247-1248
- 33) Marchesi V.T., Tillack T.W., Jackson R.L., Segrest J.P. und Scott R.E. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci US* 69, 1445-1449
- 34) Hamaguchi H. und Cleve H. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 278, 271-280
- 35) Marchesi V.T., Segrest J.P. und Kahane I. (1972) in "Membrane Research" (Fox C.F. Herausgeber), S. 41-51 Academic Press, New York, London
- 36) Segrest J.P., Jackson R.L. und Marchesi V.T. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 964-969
- 37) Hamaguchi H. und Cleve H. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 459-464

- 38) Segrest J.P., Kahane I., Jackson R.L., Marchesi V.T. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 155,167-183
- 39) Segrest P.S. und Kohn L.D. (1974) in "Protides of the Biological Fluids" (Peeters H. Herausgeber), Band 21, 183-189 Pergamon Press, Oxford
- 40) Marchesi V.T., Jackson R.L., Segrest J.P. und Kahane I. (1973) Fed. Proc. 32, 1833-1837
- 41) Winzler R.J. (1973) in "Hormonal Proteins and Peptides", (Li C. Herausgeber) Band 1, S. 1-15 Academic Press, New York, London
- 42) Lisowaka E. und Jeanloz R.W. (1973) Carbohydrate Res. 29, 181-191
- 43) BØG-Hansen T.C. und Bjerrum O.J. (1974) in "Protides of the Biological Fluids" (Peeters H. Herausgeber) Band 21, S. 39-43 Pergamon Press, Oxford
- 44) Hulla F.W. (1974) Biochim. Biophys. Acta 345, 430-438
- 45) Hulla F.W. und Gratzner W.B. (1972) Febs Lett. 25, 275-278
- 46) Dunn M.J. und Maddy A.H. (1973) Febs Lett. 36, 79-82
- 47) Maddy A.H. und Dunn M.J. (1974) in "Protides of the Biological Fluids" (Peeters H. Herausgeber) Band 21, S. 21-26 Pergamon Press, Oxford
- 48) Palmer F.B.St.C. und Verpoorte J.A. (1971) Can. J. Biochem. 49, 337-347
- 49) Gutrow C.E., Allen J.E. und Rasmussen H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 8145-8153
- 50) Roses A.D. und Appel S.H. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1408-1411
- 51) Rubin C.S. und Rosen O.M. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 421-429
- 52) Gottschalk A. (1969) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350, 669-670
- 53) Gottschalk A. (1969) Nature 222, 452-454
- 54) Fairbanks G., Steck Th. und Wallach D.F.H. (1971) Biochemistry 10, 2606-2617
- 55) Duchon G. und Collier H.B. (1971) J. Mem. Biol. 6, 138-157
- 56) Heller M. und Hanahan D.J. (1972) Biochim. Biophys. Acta 255, 239-250

- 57) Hoogeveen J.T., Cleman R.J. und Rothstein A.
(1970) J. Mem. Biol. 3, 156-172
- 58) Shimomura R., Matsumura S. und Nishizuka Y.
(1974) J. Biochem. 75, 1-10
- 59) Ciliv G. und Özand P.T. (1972) Biochim. Biophys. Acta 284, 136-156
- 60) Heller M. und Hanahan D.J. (1972) Biochim. Biophys. Acta 255, 251-272
- 61) Coleman R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 1-30
- 62) Pitt-Rivers und Impiombato F.S.A. (1968) Biochem. J. 109, 825-830
- 63) Hanahan D.J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 319-340
- 64) Tanner M.J.A. und Boxer D.H. (1972) Biochem. J. 129, 333-347
- 65) Bretscher M.S. (1971) J. Mol. Biol. 59, 351-357
- 66) Phillips D.R. und Morrison M. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1103-1108
- 67) Bakerman S. und Wasemiller G. (1967) Biochemistry 6, 1100-1113
- 68) Razin S. (1972) Biochim. Biophys. Acta 265, 241-296
- 69) Rosenberg St.A. und Guidotti G. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5118-5124
- 70) Schiechl H. (1973) Biochem. Biophys. Acta 307, 65-73
- 71) Maddy A.H. und Kelly P.G. (1971) Biochim. Biophys. Acta 241, 290-301
- 72) Reynolds J.A. und Trayer H. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7337-7342
- 73) Schubert D. (1973) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 354, 781-790
- 74) Juliano R.L. und Rothstein A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 249, 227-235
- 75) Triplett R.B., Summers J., Ellis D.E. und Caraway K.L. (1972) Biochim. Biophys. Acta 266, 484-493
- 76) Moldow C.F., Zucker-Franklin D., Gordon A., Hospelhorn V. und Silber R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 255, 133-148

- 77) Lundahl P. und Hjertén (1974) in "Protides of the Biological Fluids" (Peeters H. Herausgeber) Band 21, 27-31 Pergamon Press, Oxford
- 78) Maddy A.H. (1966) Biochim. Biophys. Acta 117, 193-200
- 79) Zahler P.H. und Wallach D.F.H. (1967) Biochim. Biophys. Acta 135, 371-374
- 80) Schubert D., Poensgen J. und Werner G. (1972) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1034-1042
- 81) Zahler W.L., Fleischer B. und Fleischer S. (1970) Biochim. Biophys. Acta 203, 283-290
- 82) Ray T.K. und Marinetti G.V. (1971) 233, 787-791
- 83) Takayama K., Mac Lennan D.H., Tzagoloff A. und Stoner C.D. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 114, 223-230
- 84) Blumenfeld O., Callopp P.M., Howe C. und Lee L.T. (1970) Biochim. Biophys. Acta 211, 109-123
- 85) Demus H. und Mehl E. (1970) Biochim. Biophys. Acta 211, 148-157
- 86) Miller D.M. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 716-722
- 87) Philippot J. (1971) Biochim. Biophys. Acta 225, 201-213
- 88) Bornens M. und Kasper C.B. (1973) J. Biol. Chem. 248, 571-579
- 89) Kirkpatrick F.H., Grodesky St. und Marinetti G.V. (1974) Biochem. Biophys. Acta 345, 154-161
- 90) Lenard J. (1970) Biochemistry 9, 1129-1132
- 91) Colora-Ultraphor: Apparat für analytische und präparative Gelelektrophoresen, Gerätebeschreibung und Bedienungsanleitung, Ausgabe 1972, Colora Messtechnik GmbH, 7073 Lorch
- 92) Lunney J., Chrambach A. und Rodbard D. (1971) Anal. Biochem. 40, 158-173
- 93) Rodbard D. und Chrambach (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. 65, 970-977
- 94) Chrambach A. und Rodbard D. (1971) Science 172, 440-451
- 95) Hjertén S., Jerstedt St. und Tiselius A. (1965) Anal. Biochem. 11, 219-223
- 96) Hedrick J.L. und Smith A.J. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164

- 97) Williams D. und Reisfeld R.A. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 373-381
- 98) Maurer H.R. (1971) "Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis" 2. Aufl. Walter de Gruyter Berlin, New York
- 99) Smith I. (1968) "Chromatographic and Electrophoretic Techniques" Band 2, Heinemann, Bath
- 100) Merz D.C., Good R.A. und Litman G.W. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 84-91
- 101) Granzer E. (1958) Z. Physiol. Chemie 311, 46-53
- 102) Bagdasarian M., Matheson N.A., Synge R.L.M. und Youngson M.A. (1962) Biochem. J. 84, 103p
- 103) Craig L.C. (1962) Arch. Biochem. Biophys. 1, 112-118
- 104) Bernacki R.J. und Bosmann H.B. (1972) J. Mem. Biol. 7, 1-14
- 105) Putnam F.W. und Neurath H. (1945) J. Biol. Chem. 159, 195-209
- 106) Reynolds J.A. und Tanford C. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 1002-1007
- 107) Reynolds J.A. und Tanford C. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5161-5165
- 108) Fish W.W., Reynolds J.A. und Tanford C. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5166-5170
- 109) Lopez R.M. und Siekevitz P. (1973) Anal. Biochem. 53, 594-602
- 110) Wallach D.F.H., Knufermann H. und Wunderlich F. (1973) Febs. Lett. 33, 275-280
- 111) Margolis J. und Kenrick K.G. (1968) Anal. Biochem. 25, 347-362
- 112) Margolis J. und Kenrick K.G. (1969) Nature 221, 1056-1057
- 113) Kaltschmidt E. und Wittmann H.G. (1970) Anal. Biochem. 36, 401-412
- 114) Orrick L.R., Olson M.O.J. und Busch H. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. US 70, 1316-1320
- 115) Lenard J. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 662-668
- 116) Nees S. und Schmidt W. (1971) Abstr. Commun. 7th Meet. Eur. Biochem. Soc., S. 337

- 117) Weber K. und Osborn M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
- 118) Zacharius R.M., Zell T.E., Morrison J.H. und Woodlock J.J. (1969) Anal. Biochem. 30, 148-152)
- 119) Smith I. (1968) in "Chromatographic and Electrophoretic Techniques" (Smith I. Herausgeber) Band 2, S. 365-389 Heinemann, Bath
- 120) Putnam F.W. (1974) in "Protides of the Biological Fluids" (Peeters H. Herausgeber) Band 21, 3-18 Pergamon Press, Oxford
- 121) Neel J.V. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. US 70, 3311-3315
- 122) Springer G.F. (1970) Naturwissenschaften 57, 162-171
- 123) Jirgensons B. und Springer G.F. (1968) Science 162, 365-367
- 124) Watkins W.M. (1972) Biochem. J. 128, 114P-116P
- 125) da Silva P.P., Douglas St.D. und Branton D. (1971) Nature 232, 194-196
- 126) Thomas D.B. und Winzler R.J. (1971) Biochem. J. 124, 55-59
- 127) Anstee D.J. und Tanner M.J.A. (1974) Biochem. J. 138, 381-386
- 128) Gardas A. und Kóscielak (1973) Eur. J. Biochem. 32, 178-187
- 129) Kóscielak J., Piasek A., Górniak H., Gardas A. und Gregor A. (1973) Eur. J. Biochem. 37, 214-225
- 130) Wintzer G. und Uhlenbruck G. (1970) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 834-838
- 131) Uhlenbruck G. (1970) Naturw. Rdschr. 23, 361-365
- 132) Cowan N.J. und Robinson G.B. (1969) Biochem. J. 115, 57P
- 133) Priestley G.C., Pruyn M.L. und Malt R.A. (1969) Biochim. Biophys. Acta 190, 154-160
- 134) Gottschalk A. (1971) Chimia 25, 77-80
- 135) Schauer R. (1972) Biochem. J. 128, 112P-114P
- 136) Hynes R.O. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci US 70, 3170-3174
- 137) Cullen S.E., Schwartz B.D., Nathenson St.G. und Cherry M. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci US 69, 1394-1397

- 138) Knufermann H., Bhakdi S., Schmidt-Ullrich R.
und Wallach D.F.H. (1973) *Biochim. Biophys.*
Acta 330, 356-361
- 139) Kitao T., Kawamura H. und Hattori K. (1973) *Clin.*
Chim. Acta 47, 319-321
- 140) Righetti P.G., Perrella M., Zanella A. und Sirchia G.
(1973) *Nature New. Biol.* 245, 273-276
- 141) Atlas S.J., Shapiro B. und Green J.W.
(1973) *Biochim. Biophys. Acta* 323, 194-206
- 142) Jacob H.S. (1974) in "Protides of the Biological
Fluids" (Peeters H. Herausgeber) Band 21,
55-62 Pergamon Press, Oxford
- 143) Pohl A., Moser K. und Deutsch E. (1970) *Klin.*
Wschr. 48, 186-187
- 144) Jacob H., Amsden Th. und White J. (1972) *Proc.*
Nat. Acad. Sci. US 69, 471-474
- 145) Kitao T. und Hattori K. (1973) *Clin. Chim. Acta*
49, 353-359
- 146) Wallach D.F.H. (1972) "The Plasma Membrane"
The English Universities Press Ltd. London,
Springer Verlag New York, Heidelberg, Berlin
- 147) Hayashi S., Koomoto R., Yano A., Ishigami S.,
Tsujino G., Saeki S. und Tanaka T. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 1038-
1044
- 148) Weidekamm E., Wallach D.F.H., Lin P.S. und
Hendricks J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*
323, 539-546
- 149) Quisell D.O. und Pitot H.C. (1974) *Nature* 247,
115-116
- 150) Fitzpatrick D.F., Landon E.J. und James V.
(1972) *Nature New. Biol.* 235, 173-174
- 151) Duffy M.J. und Schwarz V. (1973) *Clin. Chim.*
Acta 49, 397-399
- 152) Horton C.R., Cole W.O. und Bader H. (1970) *Bio-*
chem. Biophys. Res. Commun. 40, 505-509
- 153) Roses A.D. und Appel S.H. (1973) *Proc. Nat.*
Acad. Sci US 70, 1855-1859
- 154) *Nature* (1973) 244, 481
- 155) Marse P.F. und Howland J.L. (1973) *Nature* 245,
156-157
- 156) Fiehn W., Kuhn E. und Geldmacher I. (1973)
Febs Lett. 34, 163-164

- 157) Butterfield D.A., Chesnut D.B., Rosses A.D. und Appel S.H. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. US 71, 909-913
- 158) Matheson D.W. und Howland J.L. (1974) Science 184, 165-166
- 159) Hartwich G., Wolf F., Becker J., Keilhack W. und Schwanitz G. (1971) Blut 23, 347-358
- 160) Kerkhoven P., Hug G. und Marti H.R. (1974) Schweiz. med. Wschr. 104, 120-121
- 161) Rosse W.F., Logue G.L., Adams J. und Crookston J.H. (1974) J. Clin. Invest. 53, 31-43
- 162) Nery R., Bullman H. und Barsoum A.L. (1973) Nature New Biol. 246, 44-46
- 163) Dodge J.T., Mitchell C. und Hanahan D.J. (1963) Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-130
- 164) Schwach G. und Passow H. (1973) Mol. Cell. Biochem. 2, 197-218
- 165) Triplett R.B., Wingate J.M. und Carraway L.K. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1014-1020
- 166) Bramley T.A. und Coleman R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 219, 210-228
- 167) Hanahan D.J., Ekholm J. und Hildenbrandt G. (1973) Biochemistry 12, 1374-1387
- 168) Hanahan D.J. und Ekholm J. (1972) Biochim. Biophys. Acta 255, 413-419
- 169) Mitchell C.D., Mitchell W.B. und Hanahan D.J. (1965) Biochim. Biophys. Acta 104, 348-358
- 170) Wallach D.F.H. und Lin P.S. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 211-254
- 171) Koblyka D., Khettry A., Shin B.C. und Carraway K.L. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 148, 475-487
- 172) Steck T., Weinstein R.S., Straus J.H. und Wallach D.F.H. (1970) Science 168, 255-257
- 173) Futterman S. und Rollins M.H. (1973) Anal. Biochem. 51, 443-447
- 174) Lowry O.H., Rosebrogh N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem. 192, 265-275
- 175) Maddy A.H., Dunn M.J. und Kelly P.G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 288, 263-276
- 176) Dunker A.K. und Rueckert R.R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5074-5080

- 177) Banker G.A. und Cotman C.W. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5856-5861
- 178) Swank R.T. und Munkres K.D. (1971) Anal. Biochem. 39, 462-477
- 179) Williams J.G. und Gratzer W.B. (1971) J. Chromatogr. 57, 121-125
- 180) Tung J. und Knight C.A. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 1117-1121
- 181) Maestracci D., Schmitz J., Preiser H. und Crane R.K. (1973) Biochem. Biophys. Acta 323, 113-124
- 182) Payne J.W. (1973) Biochem. J. 135, 867-873
- 183) Segrest J.P., Jackson R.L., Andrews E.P. und Marchesi V.T. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 390-395
- 184) Ehrlich P. (1957) in "Paul Ehrlich Gesammelte Arbeiten" (Himmelwelt F. Herausgeber) S. 178-195 Springer, London, New York, Paris
- 185) Bjerrum O.J. und Lundahl P. (1974) Biochim. Biophys. Acta 342, 69-80
- 186) Bhakdi S., Knufermann H. und Wallach D.F.H. (1974) Biochim. Biophys. Acta 345, 448-457
- 187) Guidotti G. (1972) Ann. N.Y. Acad. Sci. 195, 139-141
- 188) Reynolds J.A. (1973) Fed. Proc. 32, 2034-2038
- 189) Tashima Y. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 630-635
- 190) Avruch J. und Fairbanks G. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci US 69, 1216-1220
- 191) Marton L.S.G. und Garvin J.E. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 1457-1462
- 192) Stein W.D., Lieb W.R., Karlisch S.J.D und Eilam Y. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci US 70, 275-278
- 193) Carter Jr. J.R., Avruch Jr. J. und Martin D.B. (1973) Biochim. Biophys. Acta 291, 506-518
- 194) Avruch J., Price D.H., Martin D.B. und Carter J.R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 291, 494-505
- 195) Taverna R.D. und Langdon R.G. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 593-599
- 196) Umschau in Naturw. und Technik (1967) Heft 14, S. 462
- 197) Steck T.L. (1972) J. Mol. Biol. 66, 295-305

- 198) Shin B.C. und Carraway K.L. (1974) Biochim. Biophys. Acta 345, 141-153
- 199) Gingell D. (1973) J. Theor. Biol. 38, 677-679
- 200) Gahmberg C.G. und Hakomori S. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4311-4317
- 201) Phillips D.R. und Morrison M. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 284-289
- 202) Phillips D.R. und Morrison M. (1971) Biochemistry 10, 1766-1771
- 203) Steck T.L. (1972) in "Membrane Research" (Fox C.F. Herausgeber) S. 71-93 Academic Press New York, London
- 204) Law L.W. und Appela E. (1973) Nature 243, 83-87
- 205) Nicolson G. und Painter R.G. (1973) J. Cell. Biol. 59, 395-406
- 206) Wallach D.F.H. (1972) Biochim. Biophys. Acta 265, 61-83
- 207) Percy A.K., Schmell E., Earles B.J. und Lennarz W.J. (1973) Biochemistry 12, 2456-2461
- 208) Koch P.A., Gardner F.H. und Carter R. Jr. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1296-1299
- 209) Motulsky A.G. (1972) Fed. Proc. 31, 1286-1292
- 210) Eaton J.W., Skelton T.D., Swofford H.S., Kolpin C.E. und Jacob H.S. (1973) Nature 246, 105-106
- 211) Emmelot P. (1973) Europ. J. Cancer 9, 319-333
- 212) Furusawa M., Ikawa Y. und Sugano H. (1971) Proc. Jap. Acad. 47, 220-224
- 213) Wallach D.F.H. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci US 61, 868-874
- 214) Greenberg C.S. und Glick M.C. (1972) Biochemistry 11, 3680-3685
- 215) Neville, Jr. D. M. und Glossmann H. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6335-6338

Lebenslauf

Am 14.10.1944 wurde ich, Volker Anselstetter, als Sohn des Feinmechanikers Friedrich Anselstetter und seiner Ehefrau Margarete, geb. Zantner, in Altdorf bei Nürnberg geboren.

Dort besuchte ich die Volksschule und von 1955 bis 1961 die Oberrealschule. Anschließend trat ich in die Martin-Behaim-Oberrealschule in Nürnberg über, wo ich 1964 das Abitur bestand.

Von 1964-1966 leistete ich meinen Wehrdienst ab.

Ich begann 1966 mit dem Medizinstudium in Erlangen, legte dort 1967 das Vorphysikum, 1969 das Physikum und 1972 das medizinische Staatsexamen ab.

Im Oktober 1969 begann ich mit meiner Dissertationsarbeit im Physiologisch-chemischen Institut unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H-J. Horstmann.

1970 wurde ich in die Studienstiftung des Deutschen Volkes aufgenommen, von der ich seit Oktober 1972 ein Promotionsstipendium erhalte.

Herrn Professor Dr. W. Kersten danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für die wissenschaftliche Anleitung, die anregenden Hinweise und die äußerst wertvollen Diskussionen danke ich Herrn Professor Dr. H-J. Horstmann sehr herzlich.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990